



TITLE:

高分解能NMR法を用いた抗腫瘍抗
生物質C-1027クロモフォアのアポ
タンパク質およびDNA精密構造認
識と反応メカニズムに関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

奥野, 恭史

CITATION:

奥野, 恭史. 高分解能NMR法を用いた抗腫瘍抗生物質C-1027クロモフォアのアポタンパク質およびDNA精密構造認識と反応メカニズムに関する研究. 京都大学, 2000, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2000-09-25

URL:

<https://doi.org/10.11501/3174935>

RIGHT:

高分解能NMR法を用いた抗腫瘍抗生物質C-1027クロモフォアの
アポタンパク質およびDNA精密構造認識と反応メカニズム
に関する研究

2000

奥野 恭史

高分解能NMR法を用いた抗腫瘍抗生物質C-1027クロモフォアの
アポタンパク質およびDNA精密構造認識と反応メカニズム
に関する研究

2000

奥野 恭史

目次

序論 1

第一章 C-1027クロモフォア-DNA複合体の構造解析と精密分子認識機構 ……5

- 1 C-1027クロモフォア-DNAオリゴマー複合体のNMR測定
- 2 C-1027クロモフォア-DNAオリゴマー複合体の立体構造解析
- 3 C1027-クロモフォアによるDNA切断反応の分子メカニズム
- 4 C1027-クロモフォア-d(GTATAC)₂複合体の構造解析

第二章 C-1027クロモフォア-アポタンパク質複合体の構造解析と精密分子認識機構 22

- 1 C-1027アポタンパク質の立体構造モデリング
- 2 C-1027のApoとChrとの複合体形成
- 3 C-1027のApo-Chr複合体モデルとApo-Chr相互作用様式

第三章 アポタンパク質結合状態およびDNA結合状態における

抗腫瘍活性種C-1027クロモフォアの動的構造変化と反応メカニズム ・・32

- 1 C-1027クロモフォアによる多分子認識様式
- 2 C-1027クロモフォアの構造変化と反応性
- 3 クロモプロテインC-1027の反応メカニズム

実験の部 46

結語および要約 52

引用文献 55

謝辭 60

序 論

20世紀における科学的偉業の1つにワトソン、クリックによるDNA 2重らせん構造モデルの提出があげられる¹。そこではDNAが2重らせんという構造をとっており、その構造そのもののの中に遺伝子の示す様々な特性がみごとに集約されているという観点から、分子生物学という新しい学問分野を切り開き、今日の構造生物学の進展へとつながった。このように、生体物質群の立体構造を直接捉えることは、その生命現象解明に大きな役割を果たしうる。

本研究で取り上げた抗腫瘍抗生物質C-1027は、その活性種であるエンジインクロモフォアがアポタンパク質とDNAとの両者に結合し、片方のDNAに対してのみ切断活性を発現するという非常に数奇な抗生物質である。しかしながら、「何故、C-1027クロモフォアは、アポタンパク質内では安定に存在しており、DNAに結合することで活性化されるのであろうか？」という極めて単純な疑問が未だ解明されていない。そこで、本研究ではNMR法を中心とした構造解析を通して、C-1027のDNAおよびApo分子認識機構および反応メカニズムの解明を試みた。

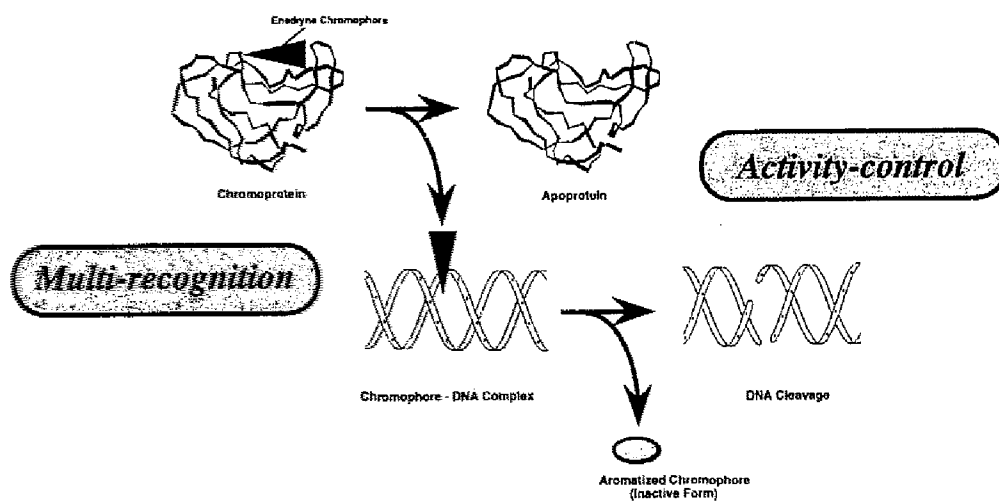
C-1027は放線菌 *Streptomyces globisporus* C-1027の培養濾液より単離された抗腫瘍抗生物質であり、グラム陽性菌および数種のグラム陰性菌に対して抗菌活性を有し、各種腫瘍細胞に対しても強力な殺細胞効果を示す^{2,4}。また、C-1027は単独で非常に不安定なクロモフォア (Chr) が、アポタンパク (Apo) に非共有結合的に会合したクロモプロテイン複合体として存在している^{5,6}。Apoは110個のアミノ酸残基から成る酸性蛋白質で⁷、不安定なChrを安定化するとともに⁸、その輸送の役割をも果たしている。一方、Chrは抗生物質C-1027の薬理活性の活性本体であり、Apoにより核内に輸送された後、Apoから放出され、DNAの特定配列を認識、切断するものと考えられている⁹。C-1027の抗腫瘍効果はこのDNA切断能に起因しており、これらの点からクロモプロテインC-1027は天然のドラッグデリバリーシステムといえる (Figure0-1)。したがってクロモプロテインC-1027

は、Chrという単一分子がDNAとタンパク質という異なる2種類の分子を認識し特異的に結合する多分子認識の性質を有しており、分子認識の観点において非常に興味深いものと言える。

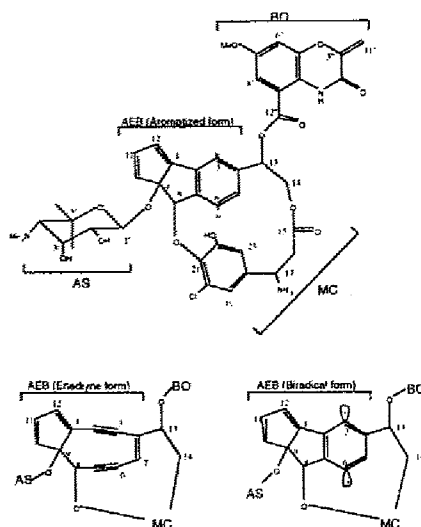
C1027-Chrの化学構造は、ベンゾオキサゾリン環(BO)、アミノ糖(AS)、クロロフェノールを含むマクロサイクリック部分(MC)、およびこれらをつなぐエンジン部分(AEB)から構成されている¹⁰⁻¹²(Figure0-2)。エンジン系化合物は、C-1027以外にもこれまで数種類発見されており、その新規な化学構造や強力な活性により、化学、薬学、医学の面からも、世界的に高い関心を集めてきた(Figure0-3)。エンジン骨格の反応は、シス型1,5-ジイン-3-エン(エンジン)が加熱下にラジカル経路でベンゼン環化するというバーグマン反応¹³(Figure0-4)に基づき、その際発生する炭素ラジカルがDNA鎖を攻撃、切断するというものである。また、現在知られているエンジン系化合物は10員環と9員環骨格の2つのエンジングループに大別される。前者(10員環)は、エスペラミシン¹⁴⁻¹⁹、カリケミシン²⁰⁻²⁴、ダイナミシン²⁵⁻²⁷であり、後者(9員環)には、ネオカルチノスタチン²⁸⁻³²、ケダルシジン³³⁻³⁶、および本研究課題のC-1027があげられる。また、9員環エンジン骨格の方が10員環骨格よりも不安定であるため、その安定化のために9員環エンジングループはクロモプロテインとして存在している。ここで特筆すべき点は、C-1027の極度の不安定性である⁸。通常、他のエンジン化合物は(10員環、9員環骨格ともに)その活性化にチオールなどの還元剤による攻撃が必要とされるのに対し、C1027-Chrはこれら反応開始剤の非存在下において自発的にバーグマン環化反応が進行する(室温で半減期10時間)⁹。したがって、「一般的なエンジン化合物の反応起爆剤である還元剤の代わりに、C-1027の反応を制御する要因があるのでしょうか？」また「何故、Apo内では反応進行せず、DNAに結合することで活性化されるのでしょうか？」というC-1027の特異的反応性から生じてくる疑問は有機反応論的視点からも非常に意義深いものである。

そこで本研究において、第1章ではC1027-Chr - DNA相互作用解析、第2章ではC1027-Chr - Apo相互作用解析、そして第3章ではDNA, 溶液中, Apo間におけるChrの動

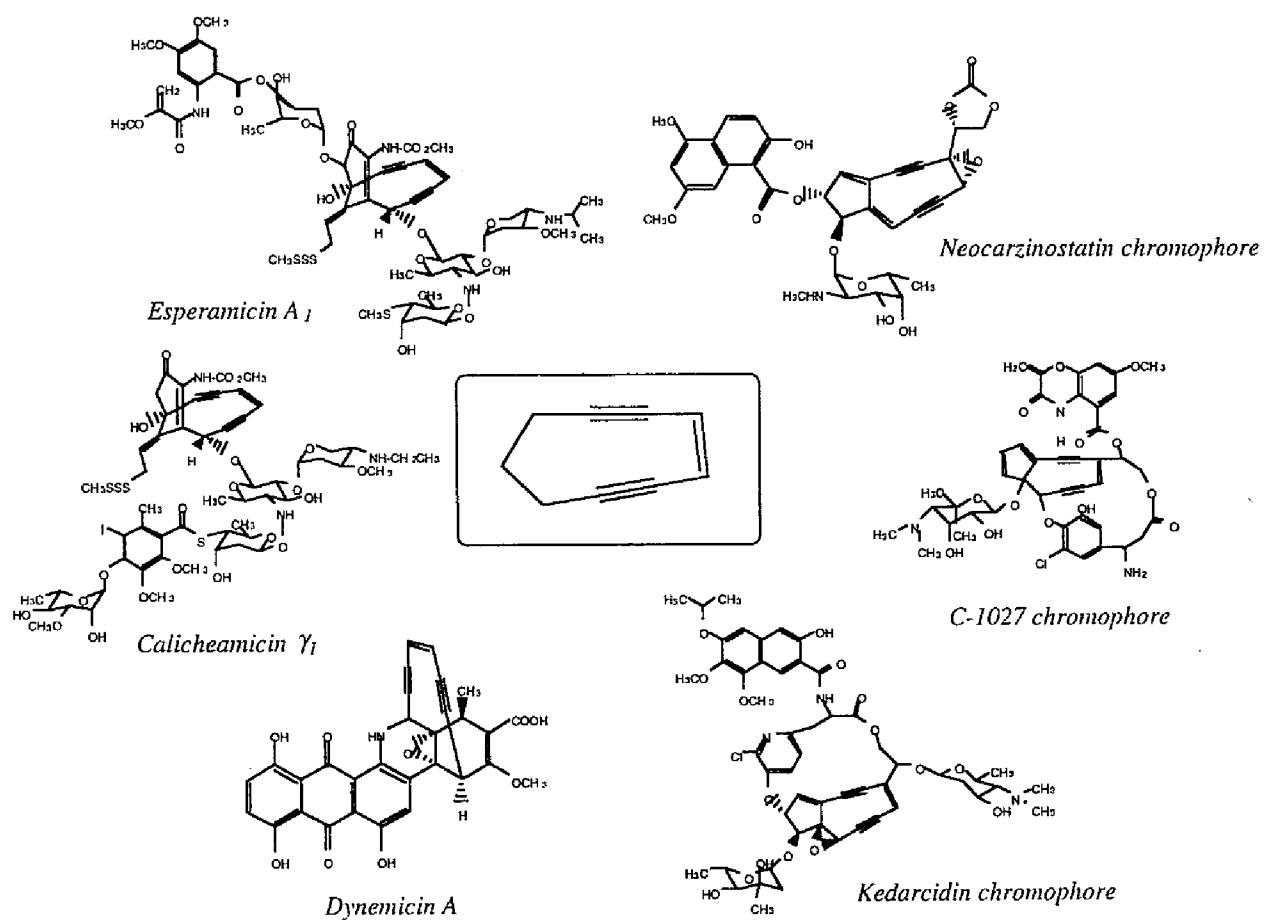
的構造変化と反応性相関に関する研究を通して、NMR立構造解析に基づく抗腫瘍抗生物質C-1027のDNAおよびApo分子認識機構および反応メカニズムを分子レベルで明らかにした。これらは単なる分子認識の解明にとどまらず、1つの分子（C1027-Chr）が生命現象の主役であるDNAとタンパク質という異なる2種類の生体高分子を認識し特異的に結合するという多分子認識の解明、さらにはそれぞれの分子認識の相違がそのままChrの活性発現の相違へとつながる構造活性相関の解明という点において有用な知見を提供している。



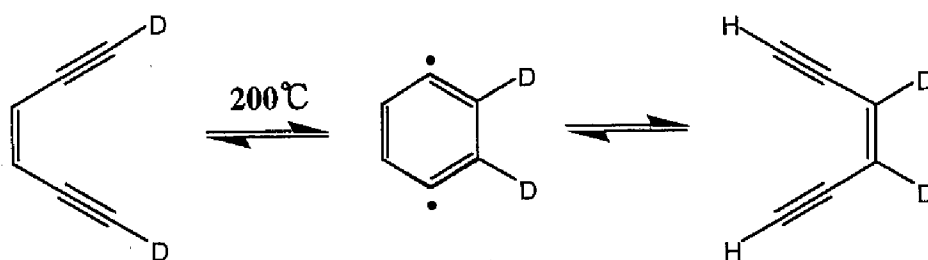
(Figure0-1) Biological function of chromoprotein C-1027



(Figure0-2) Chemical structures of aromatized (upper), enediyne (lower left), and 3,6-biradical (lower right) forms of C-1027 Chr.



(Figure0-3) Enediyne family



(Figure0-4) Bergman reaction

第一章

C-1027クロモフォア - DNA複合体

の構造解析と精密分子認識機構

C1027-アポタンパク質 (Apo) から放出されたエンジイクロモフォア (Chr) は、特定のDNA配列を認識、結合し、引き続いてDNA鎖切断を引き起こす⁹。ここでC1027-Chrはバーグマン反応を通して3位と6位にラジカルを発生し、このラジカルがDNAから直接水素を引き抜くものと考えられている^{11,37-40}(Figure 1-1)。またゲル電気泳動解析により、C1027-Chr は 配 列 5'-GTTAT / 5'-ATAAC, CTTT / AAAAG, ATAAT / ATTAT, CTTTA/TAAAG, CTCTT / AAGAG, TATAT / ATATA, AAGAT / ATCTTなどを強く認識し、互いに3'側に2塩基ずれた2本鎖同時切断を行っていた^{9,41,42}。そこで本章では、NMR法を用いたChr-DNA複合体の立体構造解析をとおして、C1027-ChrとDNAとの相互作用様式、ChrによるDNA切断反応メカニズムを原子レベルで解明した。

1、C-1027クロモフォア - DNAオリゴマー複合体のNMR測定

クロモフォアとDNAとの複合体形成

天然でApo内に包含されているC1027-Chrが単独で存在する時、有機溶媒、酸性水溶媒中では易溶性であるが、中性、塩基性水溶媒に対しては難溶性であった。このような性質からChrとDNAを単に混合させただけでは白い沈殿が生じ、複合体形成は困難であった。(例えば、酸性水溶液中ではChrは溶解するが、DNAの構造が保持されない。また、DNAの緩衝液としてリン酸緩衝液を用いると、有機溶媒中のChrとリン酸混合物が白沈を生じるなどである。) そこで様々な混合方法を検討した結果、メタノールに溶解させ

たChr 溶液に徐々にDNA水溶液 (pH7.0、NaCl数mM) を加えて行く方法がこの系にとって最適方法であることがわかった。1 : 1 複合体の形成確認は、1 次元¹H-NMRのDNA イミノプロトン領域のピーク変化を追跡することにより行った。

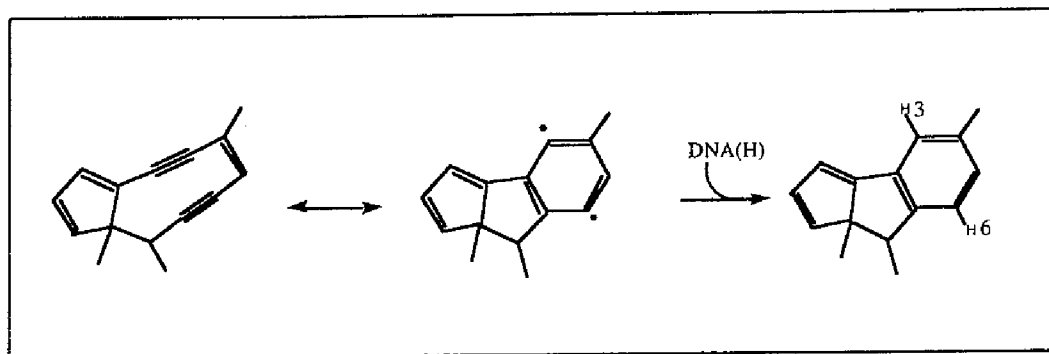
芳香環化クロモフォアとDNAオリゴマーの選択

Figure1-1に示す様に、C1027-Chrは活性型 (エンジン型)、反応中間体型 (ビラジカル型)、不活性型 (芳香環型) の3状態で存在している。測定試料として活性型のエンジン型Chrを用いるとNMR測定中にDNA切断が進み十分な測定が不可能である。またDNAからの水素引抜きメカニズムを原子レベルで解析するためにはビラジカル型に構造的に類似している芳香環型を用いる方が良いものと考えられ、これらの点からNMR測定には芳香環型Chrを使用した (Figure1-2)。

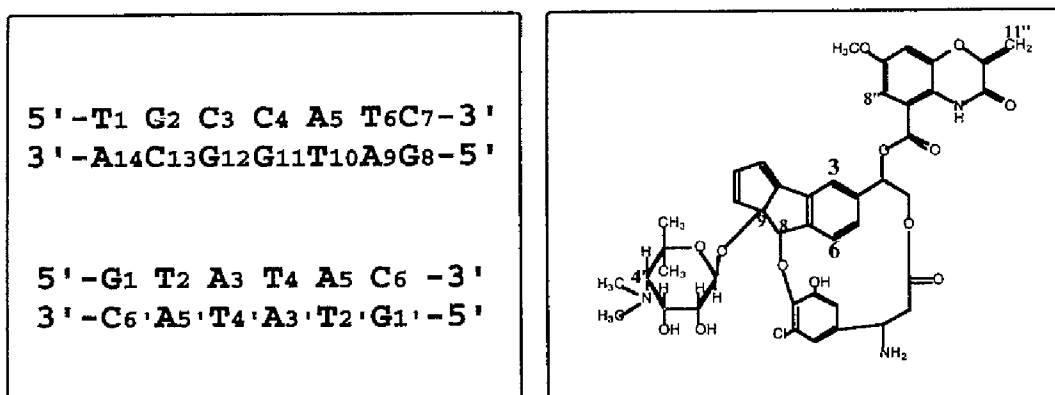
一方、本実験に用いられるDNAオリゴマーには、DNA切断の分子メカニズムを解明するためにもChrによるDNA切断配列を含んでいなければならない。そこで以前、我々の研究室およびGoldbergらによって行われたC1027-ChrによるDNA切断実験の切断パターンを参考にして次の配列を配列候補として数種類あげた^{9,41,42}。

d(GTATAC)₂, d(CGTATACG)₂, d(GCGTATACGC)₂, d(AGGTTATGCC / TCCAATACGG), d(CCTCTTG / GGAGAAC), d(GCCTCTTGC / CGGAGAACG), d(TGCCATC)/d(GATGGCA)

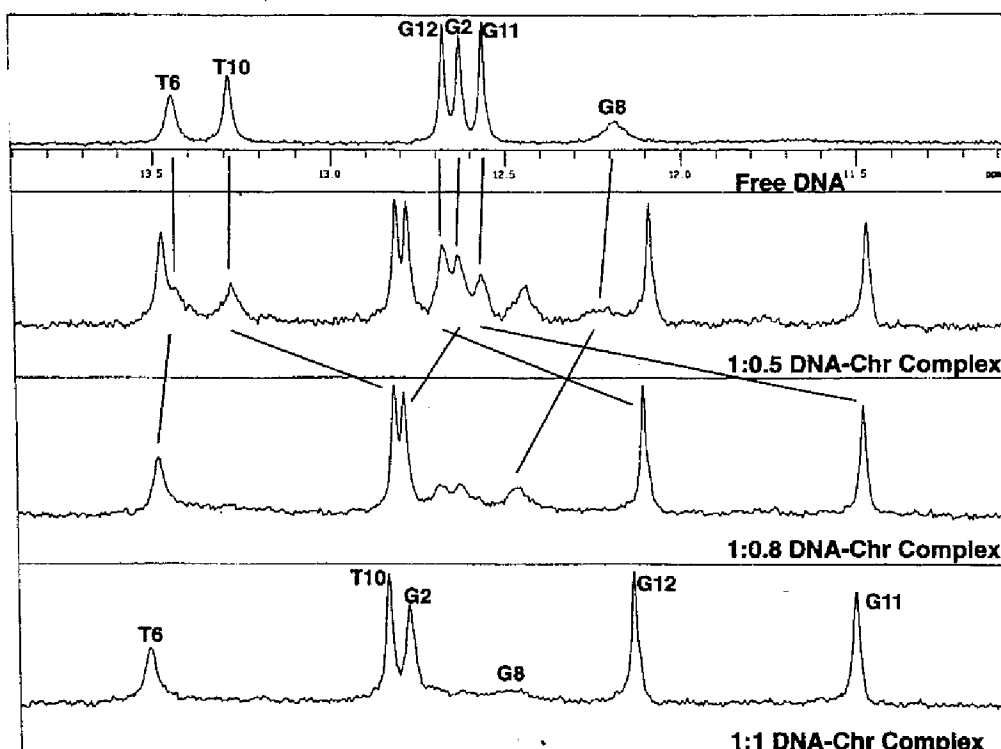
これらのDNAオリゴマーについて上記の方法で複合体を形成し、イミノプロトン領域をモニタリングした結果、自己相補鎖 d(GTATAC)₂、非自己相補鎖 d(TGCCATC)/d(GATGGCA)の2種類のオリゴマーのみ (Figure1-2) が、Chrと単一の1 : 1 複合体を形成することがわかった (Figure1-3)。他の候補配列とChrとの複合体形成によるイミノプロトン変化は、塩基対数以上のイミノプロトンピークの生成やピークの広幅化が観測され、単一のDNAオリゴマーに対しChrが複数の結合様式を有することが示唆された。このように単一の構造を示さないサンプルはNMRスペクトルおよびその解析を複雑化するため、NMR構造解析には適さないものと考えられる。



(Figure1-1) Activation mechanism of C-1027 chromophore



(Figure1-2) DNA oligomers (left) and aromatized form of C-1027 chromophore (right)



(Figure1-3) 1D plots of the imino proton spectral region of d(T₁G₂C₃C₄A₅T₆C₇)/d(G₈A₉T₁₀G₁₁G₁₂C₁₃A₁₄) - Chr complex

一次元スペクトル

上記の方法で調製した 1 : 1 複合体溶液はd-MeOH/H₂O混合溶液であるので溶媒を一度凍結乾燥により除去し、再度H₂O/D₂OおよびD₂O溶液に溶解させたものをサンプルとして用いて一次元NMR測定を行った。

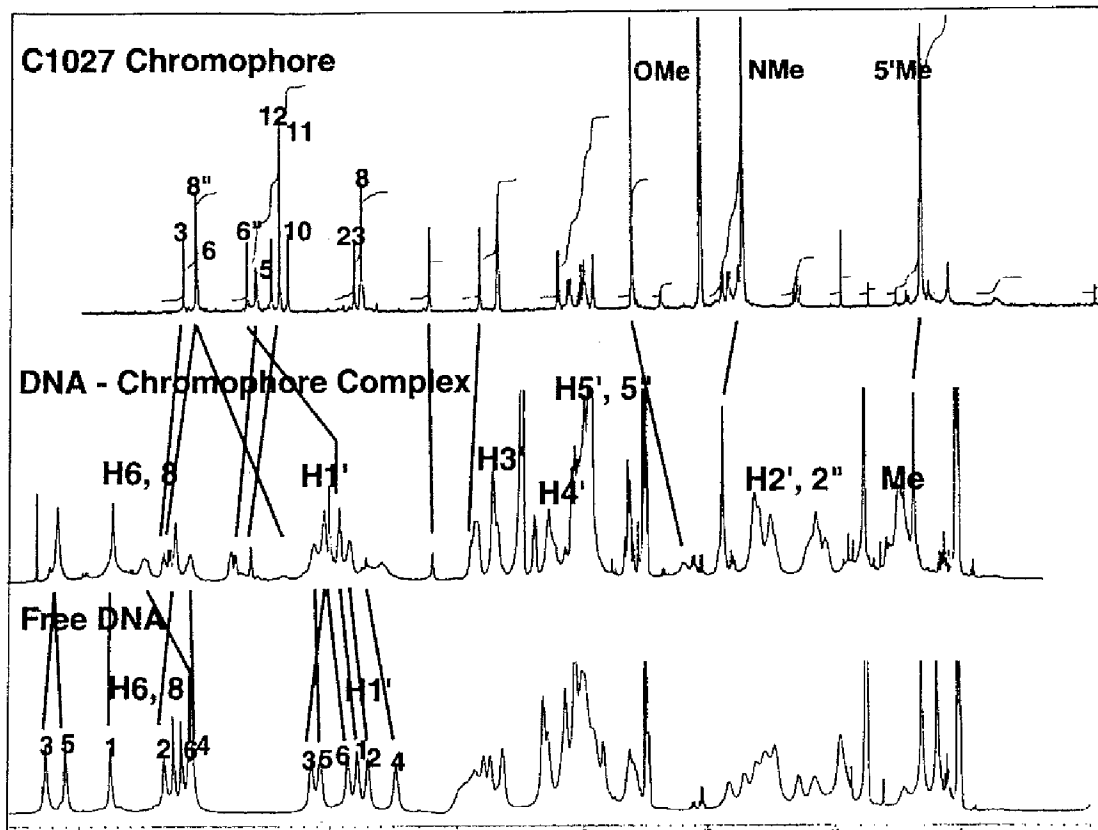
Figure1-4 および Figure1-5 に、単独の Chr、DNA オリゴマー (d(GTATAC)₂、d(TGCCATC)/d(GATGGCA))、およびChr - DNA複合体の一次元スペクトルの比較を示す。自己相補鎖d(GTATAC)₂ - Chr 複合体の易動性プロトン（イミノプロトン）は常温でも比較的鋭いピークを示すのに対し、非易動性プロトンは常温では広幅化したピークを示し、高温（40℃）にすることにより鋭いピークを得ることができた。一方、非自己相補鎖d(TGCCATC)/d(GATGGCA) - Chr 複合体は、易動性、非易動性プロトンともに常温で、鋭いピークを得ることが出来た。自己相補鎖d(GTATAC)₂ - Chr複合体についてNMRピーク解析に十分な分解能を得るためには、高温（40度）における測定が必要不可欠であったが、その反面、高温にすると構造情報を示す相関ピークが減少してしまった。一方、d(TGCCATC)/d(GATGGCA) - Chr複合体に関しては、常温測定が可能であり十分な相関ピークが得られた。これらの特徴から、以下では、常温測定が可能な非自己相補鎖d(TGCCATC)/d(GATGGCA) - Chr 複合体について、NMR測定、構造解析を紹介する。

2次元スペクトル

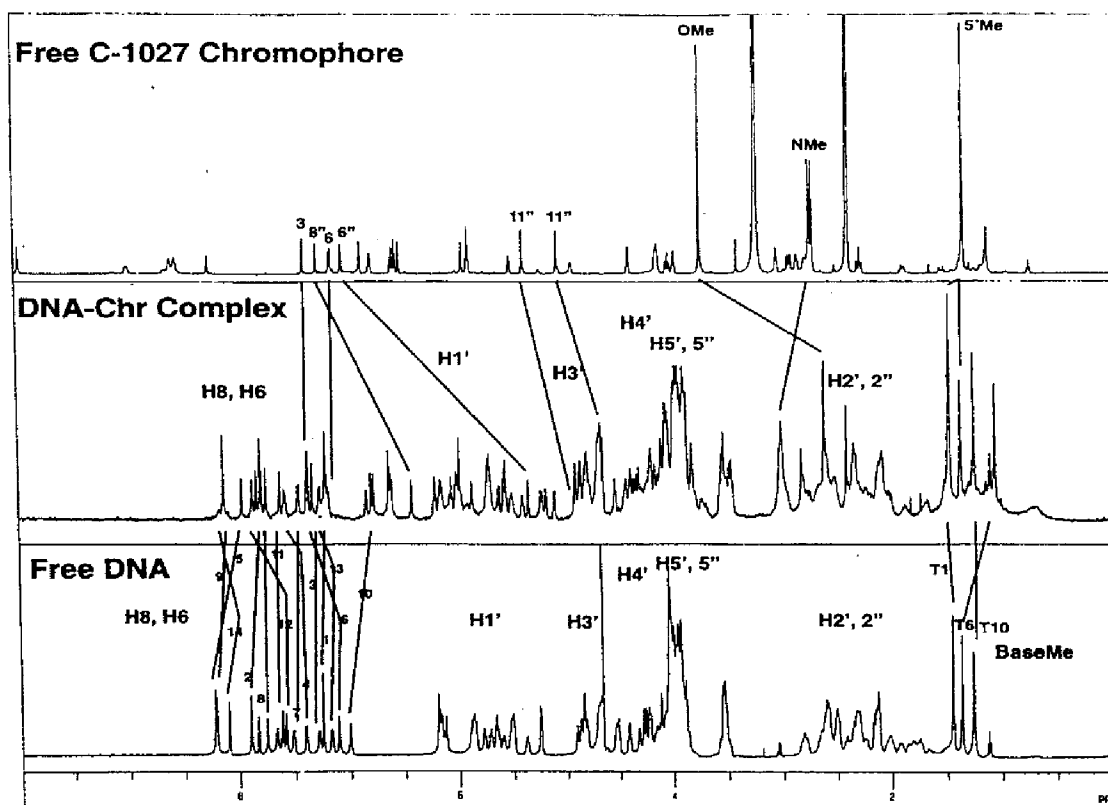
単独のChrのサンプルについてはROESY, COSY-45, ¹³C-HSQC, HMBC測定を行い帰属を行った。

Chr - DNA 複合体および単独DNAオリゴマーサンプル（H₂O/D₂O, D₂O中）については、DQF-COSY⁴³, TOCSY⁴⁴, NOESY⁴⁵測定を行った。ピークの帰属は以下の示すように完成した⁴⁶。

非易動性プロトンの帰属に関しては、まずDNAの芳香環塩基プロトン（H8/H6）と糖のプロトン（H1', H2', H2''）との間で観測されたNOE相関ピークからDNA配列に従った



(Figure1-4) 1D ¹H NMR spectra for the free C1027-Chr (upper), the Chr-d(G1T2A3T4A5C6)2 complex (middle), and the free DNA hexamer (lower). The lines show chemical shift perturbations of the aromatic protons of the Chr and the DNA oligomer.



(Figure1-5) 1D ¹H NMR spectra for the free C1027-Chr (upper), the Chr-d(T1G2C3C4A5T6C7)/d(G8A9T10G11G12C13A14) complex (middle), and the free DNA heptamer (lower). The lines show chemical shift perturbations of the aromatic protons of the Chr and the DNA oligomer.

連鎖帰属を行った。ここで複合体に関してはChrのインターカレーション⁴⁷による塩基間拡張の可能性を十分考慮したうえで実行した。つづいて、COSY, TOCSYにより、すでに帰属されたH1', H2' H2"のプロトンと糖の他のプロトン (H3', H4', H5', H5") との相関からヌクレオチド内のすべての帰属を完成させた。

Figure1-6は、単独DNAオリゴマーと複合体形成オリゴマーに関するNOESYスペクトルの塩基 (H6/H8) - 糖 (H2', H2") 領域を示している^{48,49}。これより、C3-H2', -H2"とC4-H6 およびG11-H2', -H2" とG12-H8 との相関ピークの消失が確認され、このC3G12とC4G11の塩基間拡張の可能性を示唆している。さらに、ChrのBO部分のプロトン(H6", H8", H11", methoxy-H)およびG11, G12のイミノプロトンが複合体形成により高磁場シフトしたことからも、このC3G12-C4G11間にChrのBO環がインターカレートしていることが予想される^{50,51}。

また、DNAの易動性プロトンの帰属に関しては、Chrのインターカレーションにより塩基のイミノプロトンが高磁場側にシフトし、塩基間のNOE相関ピークが消失することを十分に考慮しながら連鎖帰属を完成させた。

複合体中のChrのプロトン帰属は、DNA由来ピーク以外のピークについて、単独のChrで測定されたDQF-COSY, TOCSY, ROESYと比較することにより、比較的容易に決定することができた。

Table1-1およびTable1-2はd(TGCCATC)/d(GATGGCA) - Chr複合体の化学シフトをまとめたものである。カッコ内は単独DNA、単独Chrの化学シフトとの差（複合体形成における化学シフト変化）を表わしている。さらにFigure1-7は複合体形成によるDNAプロトン (H1', H2', 2", H3', H4', H8/H6) の化学シフト変化を棒グラフに示したものである。Figure1-7より、メジャーグループ側プロトン(H3')よりもマイナーグループ側プロトン (H1', H2', 2", H4') のシフト変化が大きいことから、Chrはマイナーグループ側から結合していることが示唆される。さらにChr全体がCCAT / ATGG領域に渡って張り付いていることも予想される。

またFigure1-8は複合体形成によるChrのプロトンの化学シフト変化を示したものである。

Figure1-8より、BO部分とAS部分のプロトンのシフト変化が大きいため、この両部分がChrのDNA結合に重要な役割を果たしているものと考えられる。

(Table1-1) Chemical Shifts of the DNA Resonances in the C1027 Chr - Heptamer Complex (ppm)

	H6/H8	H2/H5/Me	H1'	H2', 2"	H3'	H4'	H5', 5"	imino H
T1	7.25 (+0.02)	1.53 (-0.06)	5.75 (+0.06)	1.55, 2.06 (+0.22, +0.12)	4.48 (+0.06)	3.91 (+0.04)	3.53, 3.55 (+0.01, +0.01)	
G2	7.83 (+0.08)		5.74 (+0.14)	2.59, 2.62 (+0.04, +0.06)	4.84 (+0.02)	4.21 (+0.08)	3.92, 4.02 (-0.02, -0.05)	12.75 (-0.13)
C3	7.31 (-0.01)	5.15	6.02 (-0.03)	2.10, 2.24 (-0.08, +0.13)	4.76 (-0.05)	4.11 (+0.03)	3.98, 3.95 (+0.07, +0.10)	
C4	7.62 (-0.21)	5.67	5.78 (-0.37)	2.27, 2.39 (-0.21, -0.08)	4.84 (-0.1)	4.23 (-0.21)	3.92, 3.85	
A5	8.01 (+0.23)	7.37		2.29, 2.46 (+0.30, +0.36)	4.5 (-0.04)	4.45 (-0.19)	4.28, 3.99 (-0.46, -0.23)	
T6	7.42 (-0.30)	1.11 (+0.27)	6.05 (-0.12)	2.17, 2.40 (-0.46, +0.16)	4.86 (-0.12)	4.25 (-0.20)	4.03, 4.13	13.5 (-0.05)
C7	7.5 (+0.03)	5.62	6.12 (+0.03)	2.13, 2.13 (+0.01, +0.04)	4.43 (+0.02)	3.94 (+0.11)	3.87 (+0.05)	
G8	7.79 (-0.02)		5.61 (-0.07)	2.43, 2.63 (0, -0.02)	4.73 0	4.09 (+0.1)	3.6 (-0.02)	12.46 (-0.28)
A9	8.16 (+0.06)	7.84	6.2 (+0.01)	2.54, 2.86 (+0.11, 0)	4.91 (+0.02)	4.35 0	4.01, 4.10 (0, -0.01)	
T10	6.81 (+0.21)	1.3	5.45 (+0.17)	1.73, 2.33 (+0.13, -0.08)	4.72 (+0.03)	3.92 (+0.14)		12.88 (+0.41)
G11	7.66 (+0.03)		5.54 (+0.03)	2.39, 2.16 (+0.14, +0.45)	4.82 (+0.05)	4.04 (+0.2)	3.56, 3.99 (+0.39, +0.02)	11.48 (+1.1)
G12	7.91 (-0.31)		6.06 (-0.32)	2.73, 2.81 (-0.34, -0.28)	4.95 (-0.11)	4.37 (-0.11)	3.78, 4.00 (+0.19, +0.07)	12.12 (+0.56)
C13	7.25 (-0.06)	5.27	5.76 (-0.08)	1.92, 2.16 (-0.10, +0.02)	4.71 (-0.05)	3.87 (+0.11)		
A14	8.17 (-0.05)	7.88	6.24 (-0.03)	2.63, 2.37 (-0.3, +0.16)	4.58 (-0.01)	4.11 (-0.04)	3.98, 3.54 (-0.01)	

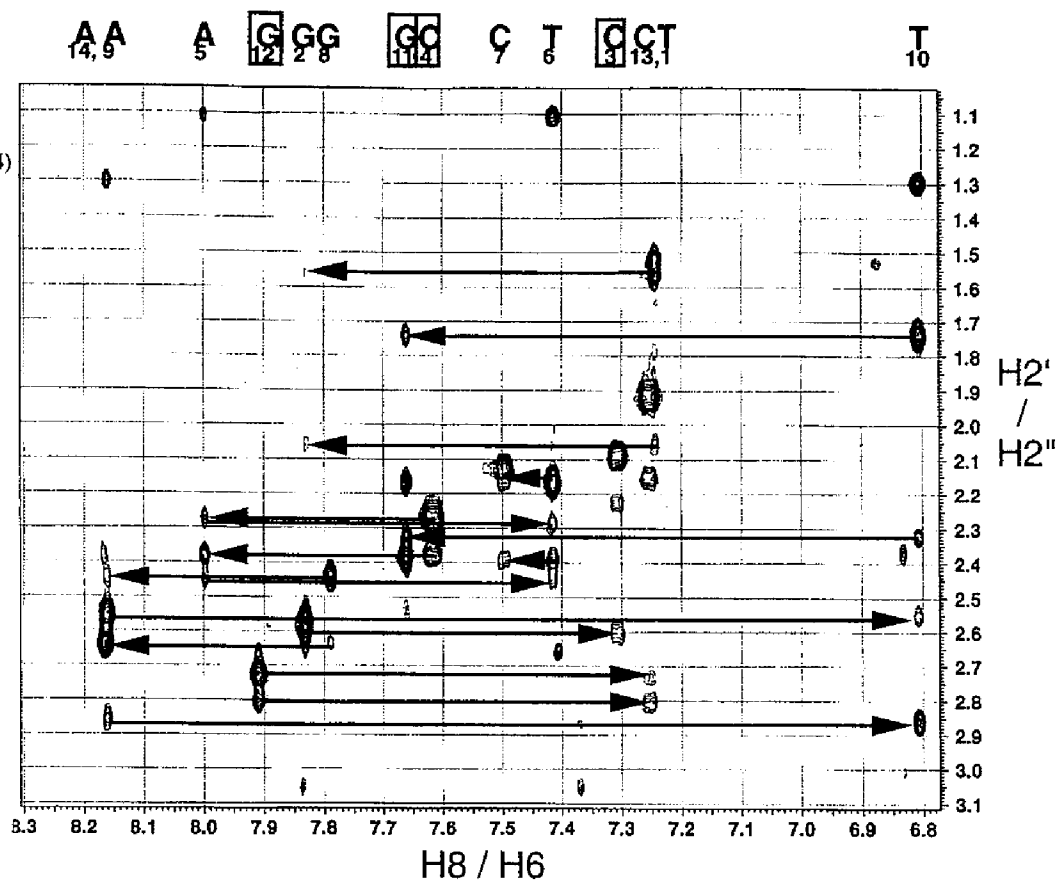
* Values in parenthese represent chemical shift changes from free oligomer.

(Table1-2) Chemical Shifts of the Chr Resonances in the C1027 Chr - Heptamer Complex (ppm)

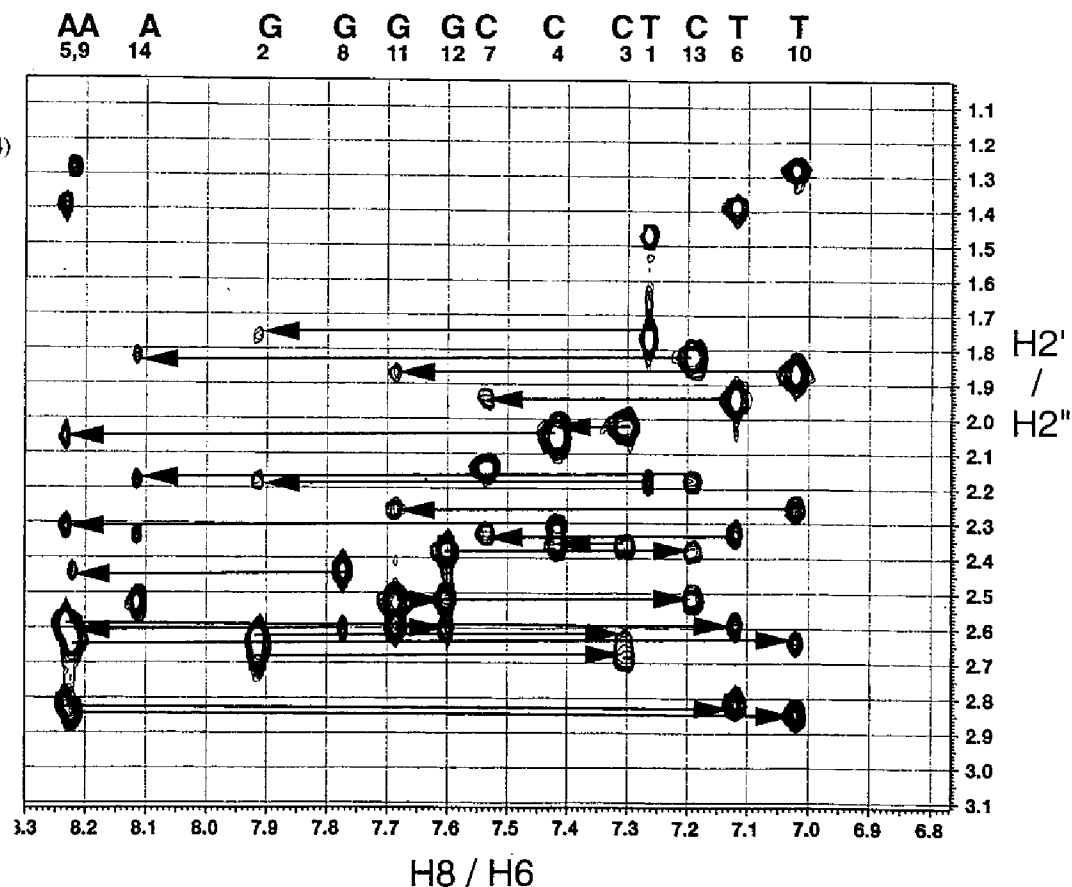
AEB						
3H	5H	6H	8H	10H	11H	12H
7.41 (+0.09)	6.67 (+0.18)	7.23 (-0.03)	6.02 (-0.04)	6.65 (-0.23)	6.88 (+0.03)	6.68 (-0.16)
MC moiety						
13H	14H	16H	17H	19H	23H	
6.19 (-0.21)	4.08, 3.73 (+0.11, +0.35)	3.01, 2.37 (-0.02, -0.03)	4.34 (-0.12)	6.84 (+0.11)	5.92 (+0.1)	
AS						
1'H	2'H	3'H	4'H	4'Nme	6'Me	
4.39 (+0.09)	3.51 (-0.59)	4.15 (-0.1)	2.87 (-0.63)	3.06 (-0.26)	1.53 (-0.11)	
BO						
6"H	8"H	11"H	7"Ome			
5.39 (+1.73)	6.46 (+0.86)	5.23, 4.9 (+0.21, +0.2)	2.66 (+1.14)			

* Values in parenthese represent chemical shift changes from free Chr.

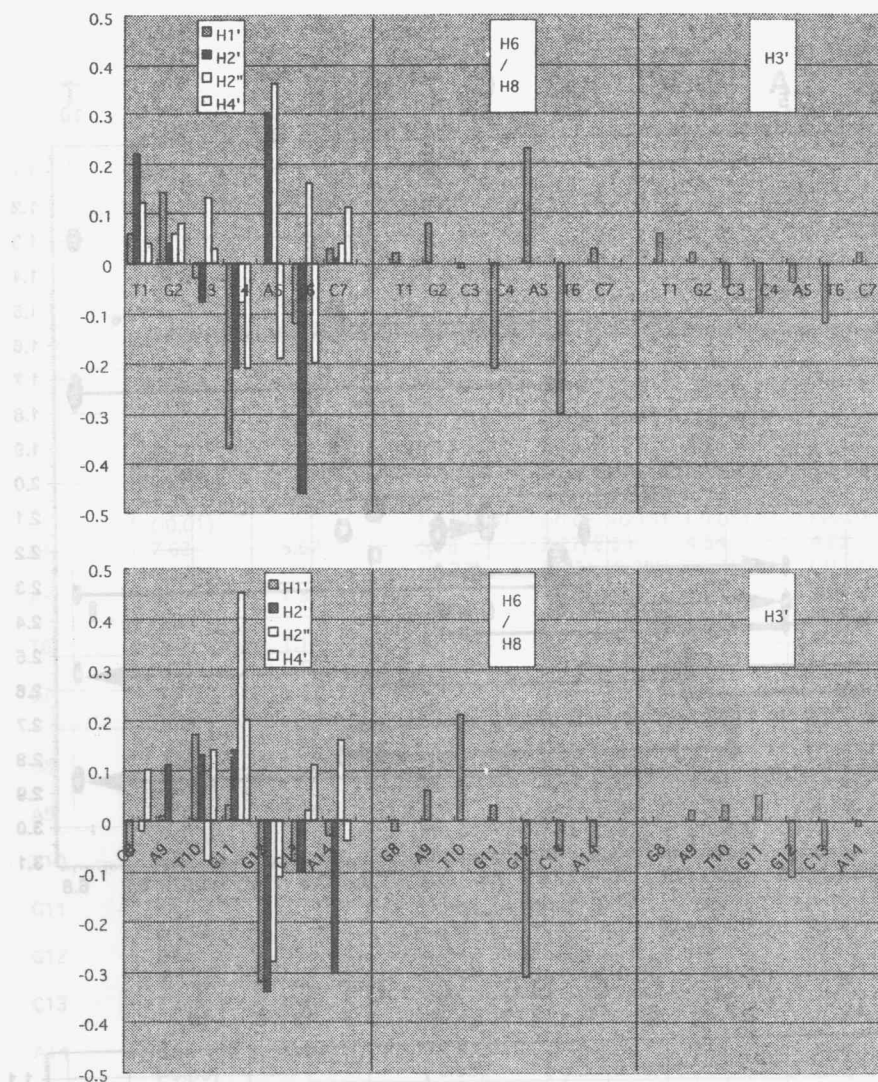
C1027-Chr -
d(T1G2C3C4A5T6G7)/
d(G8A9T10G11G12C13A14)
complex



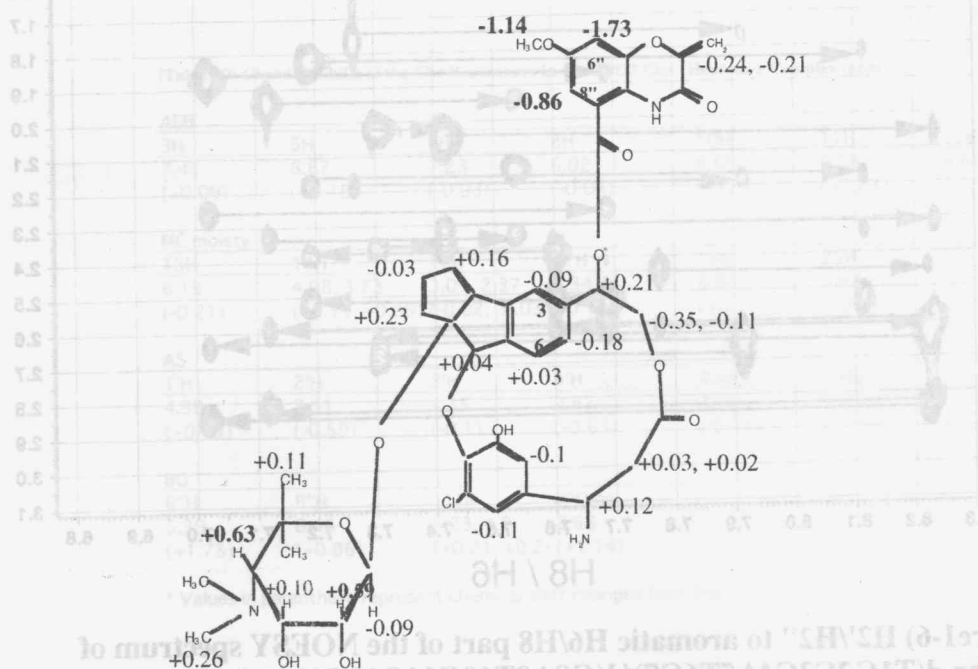
Free DNA oligomer
d(T1G2C3C4A5T6G7)/
d(G8A9T10G11G12C13A14)



(Figure1-6) H2'/H2'' to aromatic H6/H8 part of the NOESY spectrum of the Chr-d(T1G2C3C4A5T6G7)/d(G8A9T10G11G12C13A14) complex (upper) and free DNA oligomer (lower). The arrow lines trace the sequential connectivities from H6/H8 protons to interresidue H2'/H2''. The boxed bases point to the absence of interresidue NOEs.



(Figure1-7) Chemical shift changes of d(T1G2C3C4A5T6C7) (upper) and d(G8A9T10G11G12C13A14) (lower) upon complexation with C1027-Chr



(Figure1-8) Chemical shift changes of C1027-Chr upon complexation with DNA oligomer . ($\delta_{\text{bound}} - \delta_{\text{free}}$)

2、C-1027クロモフォア - DNAオリゴマー複合体の立体構造解析

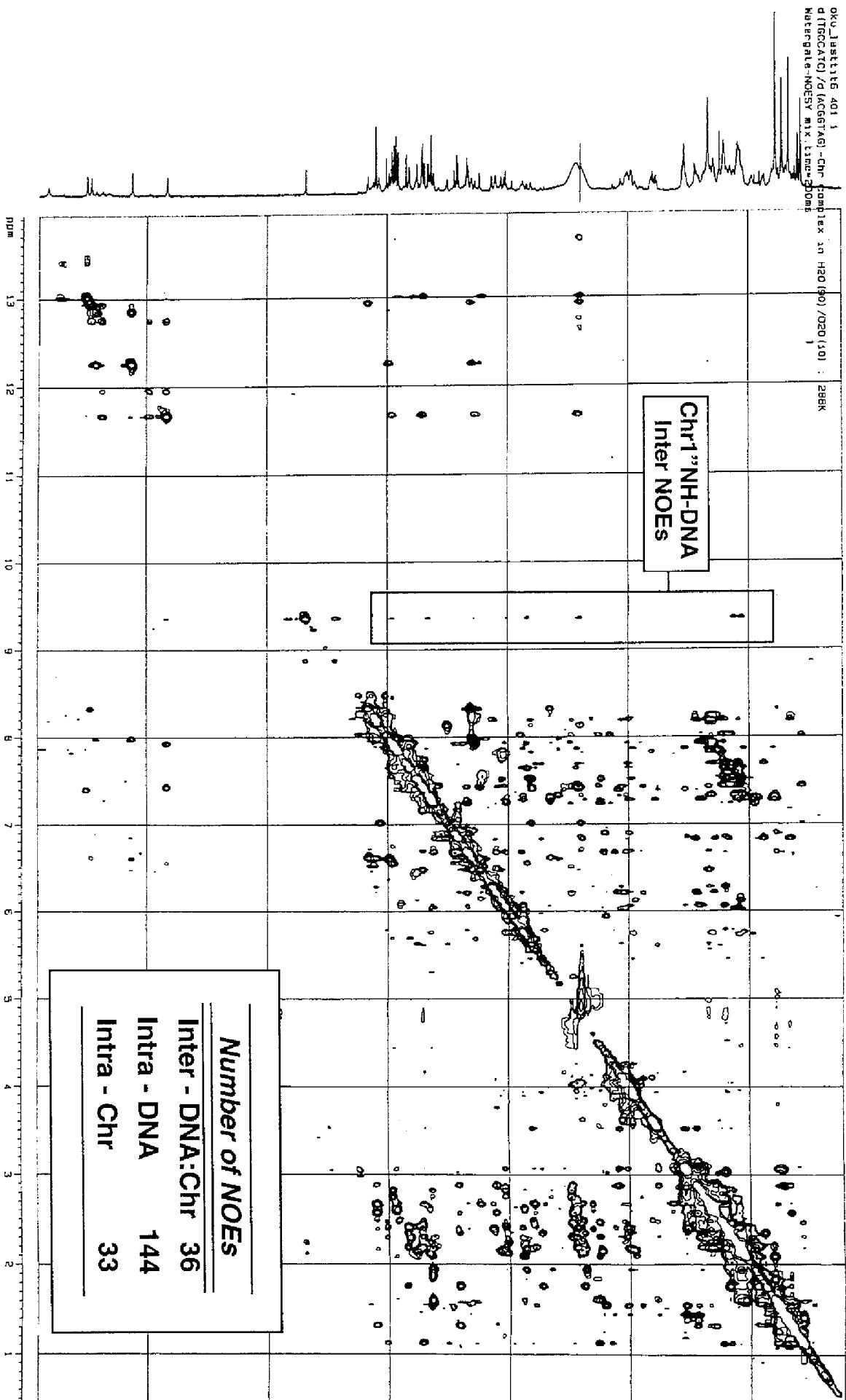
NOE距離束縛分子動力学計算による立体構造構築

原子と原子が接近しているとき、NOE相関ピークが現われる。したがって、本研究の中心課題の一つであるChrとDNAとの相互作用の解明にもっとも有用な情報を提供してくれるのはNOE相関ピークといえる。d(TGCCATC)/d(GATGGCA) オリゴマーとChrとの複合体のNOEピークは、DNA 分子内NOE144個、Chr分子内NOE33個、分子間NOE36個の合計213個のNOE ピークが決定された。DNA-Chr 分子間NOEが36個観測されたことは、Chrの全プロトン数42個であることから考えて、比較的多くの分子間NOEが観測されたと言える (Figure1-9)。

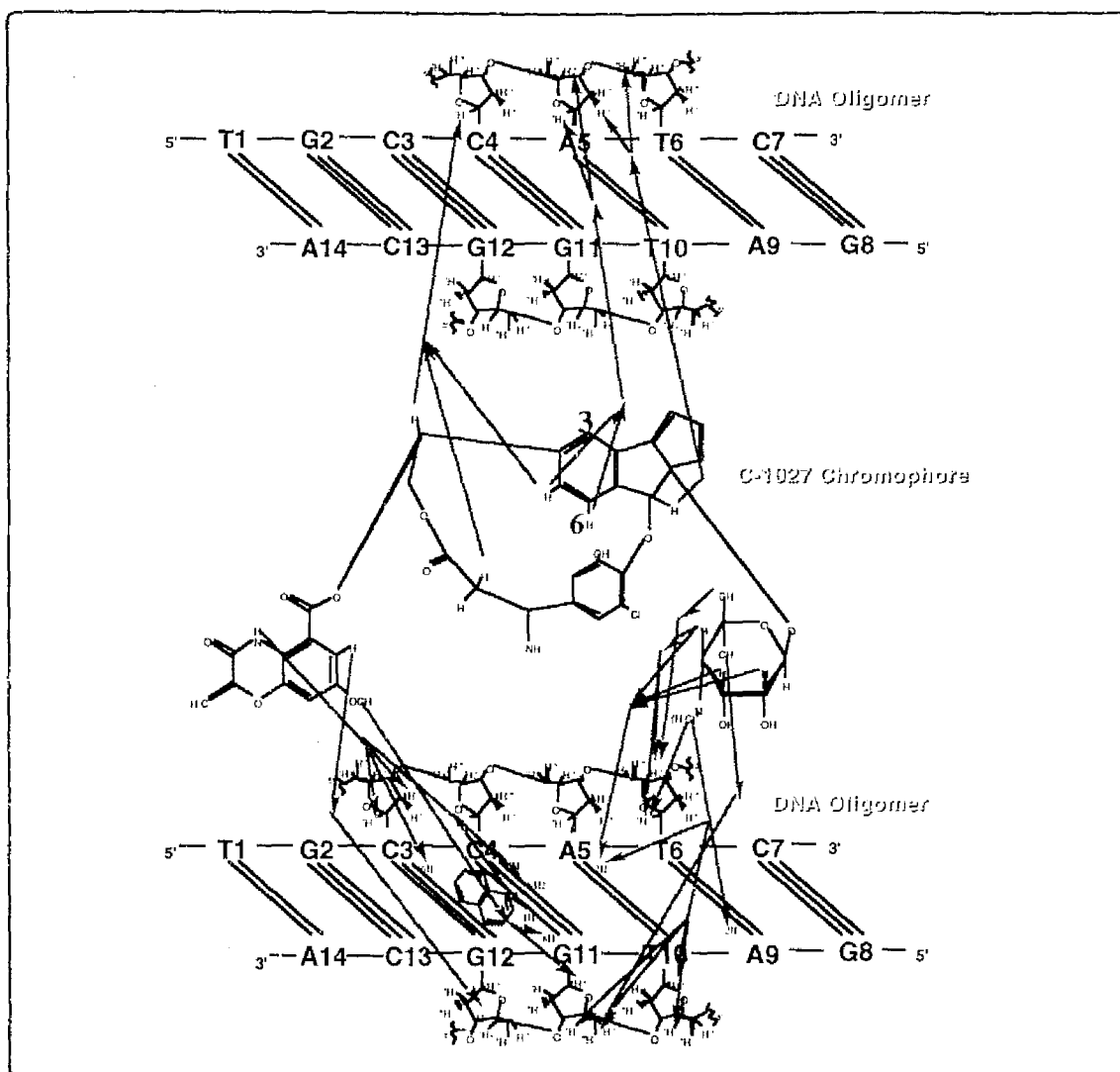
それぞれのNOEピーク強度から算出された原子間距離に基づいて、最大値：原子間距離+0.5 Å、最小値：1.8 Å の範囲の距離束縛条件を与えながら分子動力学計算（シミュレーティッドアニーリング）を行い、立体構造モデルの最適化を計った。分子動力学計算最終4psの時間内に発生した8個の複合体構造モデルの平均pairwise RMSD値は0.72 Åであり収束状態の良い計算結果であった。また、得られた最適化構造（平均化エネルギー最小化構造）は全ての原子間NOE算出距離を満たす構造であった。FigureC-1およびFigureC-2はChr - DNA複合体の最適化平均構造をに示している。

クロモフォア - DNA相互作用

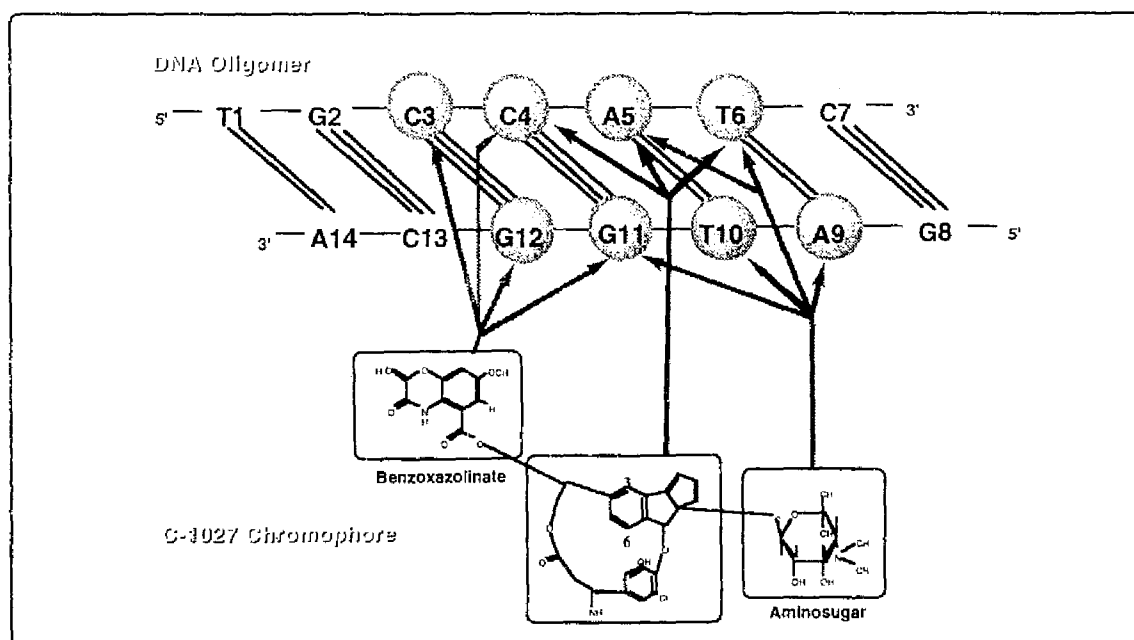
Figure1-10 および Figure1-11は、ChrとDNAとの分子間NOEをまとめたものである。ここでベンゾオキサゾリン環、アミノ糖とDNAとの分子間NOEの数は観測されたすべての分子間NOE数の75%を占めていた。これは、BO部分とAS部分の両部分がDNAの認識に重要な役割を果たしていることを示唆している。実際、DNA-Chr複合体モデル (FigureC-2) から、Chrが、BO部分のC3G12-C4G11塩基対間へのインターカレーション、およびAS部分のA5T6 / A9T10G11配列のマイナーグループへの結合を通して、DNAのC3C4A5T6 / A9T10G11G12を認識していることが裏付けられる。



(Figure1-9) NOESY spectrum of the d(TGGCATC)/d(GATGGCA) - Chr complex
in H₂O/D₂O (mixing time = 200ms)



(Figure1-10) Intermolecular NOEs between DNA and C1027-Chr



(Figure1-11) Interaction between DNA and C1027-Chr based on NOEs

以下において、Chrの各部分とDNAとの相互作用について分子間NOEおよびモデルを参考にしながら説明する。(Figure1-10, Figure1-11, FigureC-2)

(1) ベンゾオキサゾリン環部分(BO)とDNAとの相互作用

BO環のプロトンとC3、C4、G11塩基のプロトンとのNOE (BOの1''-NHと塩基のC3-H6、C4-H6、-NH₂とのNOEピーク、およびBOのOMeと塩基のG11-H8、-H1とのNOEピーク) は、BOが(C3・G11)-(C4・G12)塩基間にインターカレートしていることを示している。しかも2つの6員環からなるBOの1''-NH側の6員環をC3-C4のピリミジン環側に、OMe基をもつ6員環をG11-G12のプリン環側に配向するように突き刺さっている。また、BO環プロトンとDNAマイナーグループ側の糖のプロトンとのNOE (BOの1''-NHとC3のH1', H2', 2''とのNOEピーク、ならびにBOのOMeとG11のH1'とのNOEピーク) が幾つか観測されたこと、およびエンジン部分との結合部位から最も遠い位置にあるH6''とメジャーグループ側のG12-H3'とのNOEが観測されたことから、BO環はマイナーグループ側から突き刺さり、メジャーグループ側に突き抜けるほど深くインターカレートしていることがわかる。このようにBO環はインターカレートによる π - π Stacking相互作用によってDNAと安定に結合している。また、BOのOMeとG11-H1'のNOEから、バルキーなOMe基は塩基間を完全に突き抜けることなくマイナーグループ側に存在し、G11のC1'とのvan der Waals相互作用を通して結合の安定化に寄与しているものと思われる。

(2) アミノ糖部分(AS)とDNAとの相互作用

ASの β 位のプロトン (H2', H3', H4', 6'-Me β) はT6-H1', -H4'やA5のH2とNOEが観測され、 α 位のプロトン (4'-NMe, 6'-Me α) はA9-H2、T10-H1', -H4', G11-H4', -H5', 5''とNOEが観測された。このことは、ASがA5T6 / A9T10G11とvan der Waals相互作用によるbackbone helical contactしていることを示している。しかも、ASは α 位のプロトンがA9T10鎖側に向き、 β 位のプロトンがA5T6側を向くように配向している。また、ASとDNAと2種類のminor groove floor contactsが予想された。一つは、NOE観測されたA5とA9のH2とASのH3'とのvan der Waals相互作用であり、もう一つはモデルから予測されたASの2'-OHと、G11の2-NH₂との水素結合の可能性である。特にこのG11-2NH₂と

AS-2'OHとの水素結合は、以前当研究室で5'-AGG配列の中央のグアニンNH₂がChrの認識に重要な役割をはたしているという実験事実と一致している⁵²。

(3) AEB環とDNAとの相互作用

AEB環のH5、H6、H8はDNAのC4(H1')、A5(H1',H4')、T6(H5')とNOEが観測されたことから、AEB環はこれらのDNA糖鎖とvan der Waals相互作用によるbackbone helical bindingをしている。一方、AEB環と反対鎖[d(GATGGCA)]とのNOEは観測されなかったことから、AEB環は比較的d(TGCCATC)側に片寄っているものと思われる。

(4) MC部分とDNA相互作用

MC部分とDNAとの間には、Chr-H16とC4-H1'のNOEが観測されたのみであった。これは、DNAとMC部分がほとんど相互作用していないことを示している。

C1027-Chrの結合によるDNAの構造変化

DNA-Chr複合体のDQF-COSYにおいて、DNAの糖はJ1'2', J1'2" >> J2'3', J3'4'というC2'-endoに特徴的なJ値を全体的に示していた。したがって、Chrが結合してもDNA構造はB型に近い構造をしている。またモデルから、マイナーグループの幅は9.86 Åと典型的なB型DNAに比べて拡張した構造をしており、インターカレート部分はバックボーンの巻戻しが生じていた⁵³。

3、C-1027クロモフォアによるDNA切断反応の分子メカニズム

上述のように、Chrはバークマン環化反応によって生じた3位と6位のビラジカルがDNAの糖鎖から水素を引き抜くことにより、DNA切断を誘起するといわれている。したがって、この3位、6位の炭素（あるいは水素）に接近したDNAの水素を同定することによって、DNA切断反応の原子レベルでの解明が可能となる^{11,37-40}。ChrとDNAとの分子間NOEから6位のプロトンとDNA-A5の1'位、4'位のプロトンとの接近が予想され、

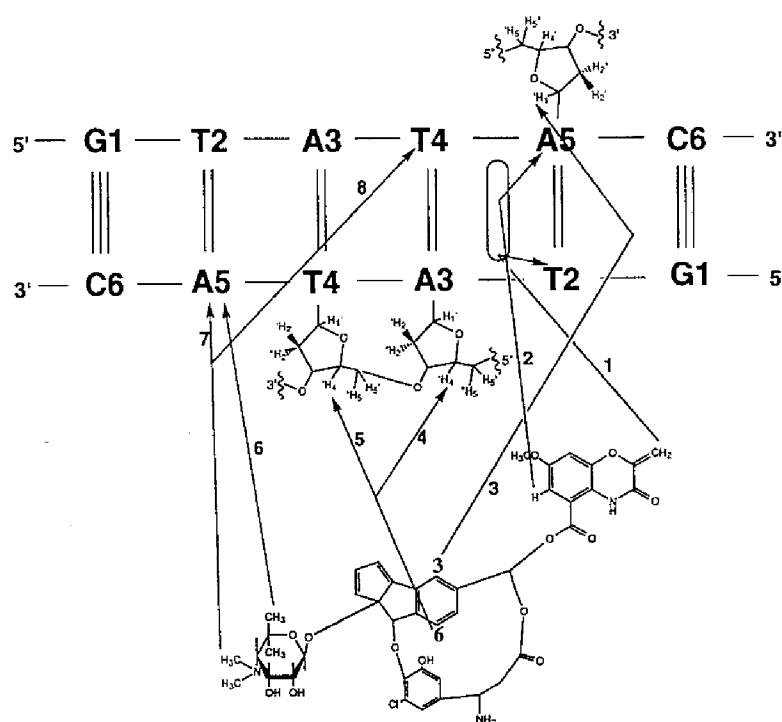
実際に構築モデル (FigureC-2) からChr 6 位の水素はC1'、C4'の水素とそれぞれ3.26 Å、2.18 Åの距離に位置していた。一方、Chr 3 位のプロトンはDNAのプロトンとの分子間NOEが観測されなかったが、構築されたモデルからDNAのG12-H1'に最も接近している(4.72 Å) ことがわかった。したがって、Chr はd(TGCCATC)/d(GATGGCA)を攻撃する際、Chr 6 位のラジカルがA5-C1'あるいは-C4'から水素を引き抜き、Chr 3 位ラジカルがG12-C1'から水素を引き抜くことによってDNA切断が実行されるものと考えられる。これは実際にゲル電気泳動法による実験からCCA/TGGでの切断が観測されている⁴¹。

4、C1027-Chr - d(GTATAC)₂複合体の構造解析

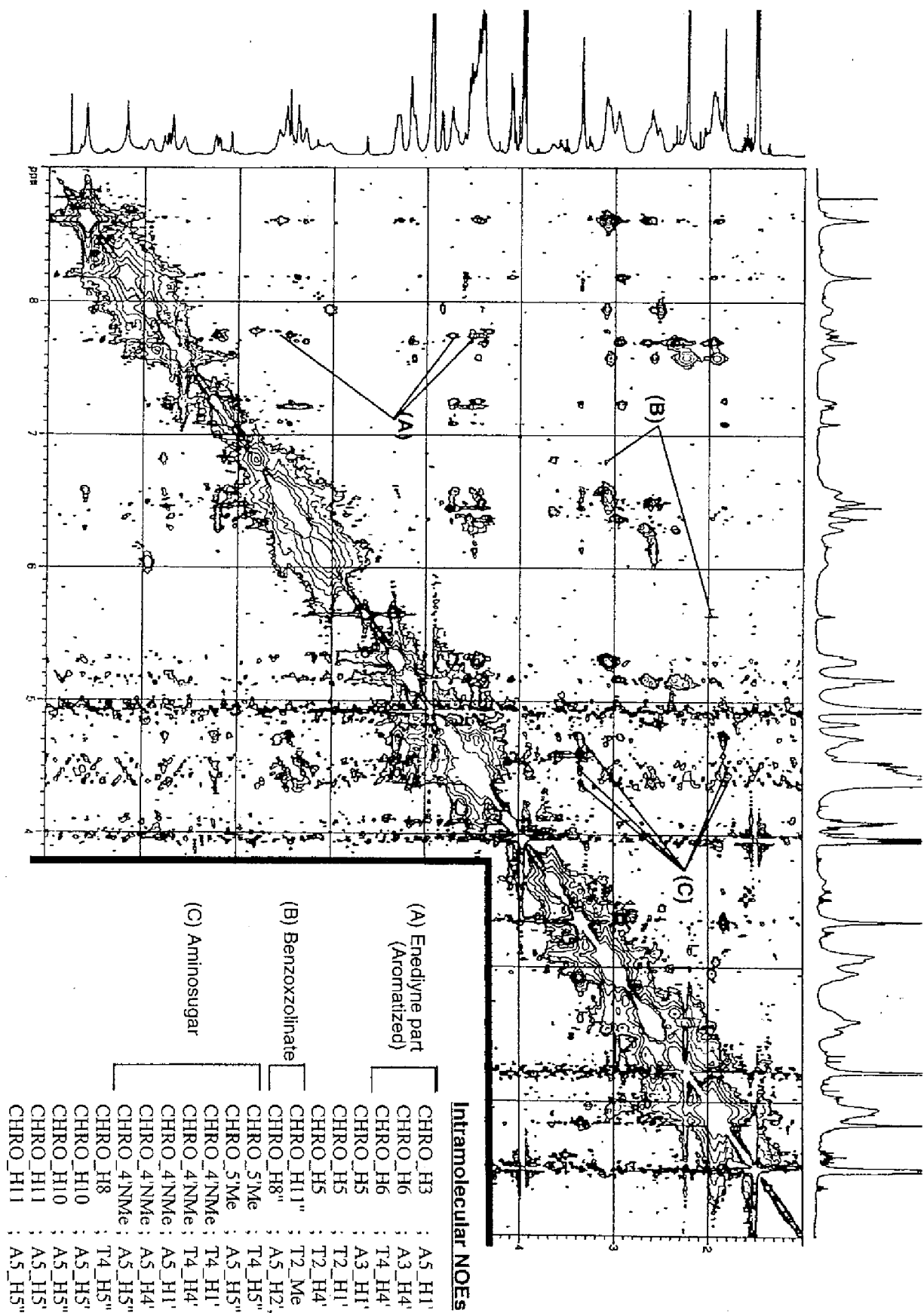
Chrとd(GTATAC)₂との複合体はd(TGCCATC)/d(GATGGCA)との複合体よりもChrの交換速度(系の安定性)に関する点、および自己相補鎖からくる帰属のあいまいさの点から精密さに欠け、観測されたNOEピークも分子内105、分子間20個とd(TGCCATC)/d(GATGGCA)-Chr複合体モデルよりも少なかった (Figure1-12, Figure1-13)。精密さには欠けるがNOEピークからの距離拘束分子動力学計算により、モデル構築を行った (FigureC-3)。その結果、詳細な原子どうしの認識は異なるもののChrとDNAの塩基どうしの認識、全体的な配向はほぼd(TGCCATC)/d(GATGGCA)-Chr複合体と類似するものであった。すなわちChrはBO環をT2'A5-A3'T4間にインターカレートし、ASを(A3T4)/(A5'T4)と相互作用させることによりマイナーグループからはりついていた。さらにインターカレートしているBOのOMeを有する6員環から見て3'側に位置する塩基A5(H1')とChrの3位のプロトンが近接していること、ならびに反対鎖T4'(H4')と6位のプロトンが近接していることも類似していた。(DNAの水素引き抜き切断反応もこれらA5-C1', T4'-C4'の水素引き抜きによって起こっていることが予想され、この結果はGoldbergの研究と一致していた。) また複合体のDNAもB型に近い構造をしており、この点でもd(TGCCATC)/d(GATGGCA)-Chr複合体と共通している。唯一異なる点はChr 6位のプロト

ンがT4'のみならずA3'のH4'と接近しており、Chr 6位のラジカルはT4'のC4'水素以外にA4'のC4'水素も引き抜く可能性があるものと考えられる。(このことも、Goldbergらの実験と一致している⁴²⁾。)

以上のように、d(GTATAC)₂-Chr複合体モデルが、d(TGCCATC)/d(GATGGCA)-Chr複合体モデルとほとんど類似していることから、本研究で解明されたC1027-ChrのDNA結合様式が他のDNA認識配列に対しても通用する普遍性なものであることが示された。



(Figure1-12) Schematic Diagram Showing the Intermolecular NOEs between DNA and C-1027 Chromophore



(Figure1-13) NOESY spectrum of the Chr - d(GTATAC)2 complex in D2O (mixing time =300ms)

第二章

C-1027クロモフォア - アポタンパク質複合体

の構造解析と精密分子認識機構

C-1027はアポタンパク質 (Apo) がエンジイクロモフォア (Chr) を非共有結合的に包含したクロモプロテイン複合体として存在している。Apoは110個のアミノ酸によって構成される酸性タンパク質で、単独では非常に不安定なChrの安定化および薬物輸送の役割を果たしている⁷。しかし、これまで活性本体Chrが非常に不安定であるために⁸、Apo-Chr複合体の解析は困難を極めていた。そこで、本章では、分光学的、計算化学的手法を用いてApo-Chrの相互作用解析を行い、これにNMR法による構造解析を加えることにより、ApoによるChr安定化機構の分子メカニズムを追究する。

1、C-1027アポタンパク質の立体構造モデリング

Figure2-1は、C-1027、ネオカルチノスタチン(NCS)³²、ならびにアクチノキサンチン (AXN)⁵⁴のアポタンパク質のアミノ酸1次配列を示している。ここで、C-1027はNCSとは43%のホモロジーであるのに対し、AXNとは93%と非常に高いホモロジーを有している。

そこで、最も相同性が高く、X線結晶構造が解明されているアクチノキサンチン-Apoのpdb結晶データ⁵⁵に基づいて、C1027-Apoの立体構造モデルの構築を試みた。まず、主鎖の座標を固定し、AXNとは異なる7つのアミノ酸残基について側鎖のみをC1027-Apo由来の側鎖に変換した。AXNには存在しないSer23, Gly24の主鎖座標は、NCSのAla24, Gly25の主鎖の座標データ³²を用いてC1027-Apoに挿入した。このように得られたC1027-Apo構造モデルに関して、CHARMm力場⁵⁶のもとSteepest descent(SD)エネルギー最

適化計算⁵⁷を施し、最適化構造モデルを得た (Figure2-2)。

NCS	Ala - Ala - Pro - Thr - Ala - Thr - Val - Thr - Pro - Ser - Ser - Gly - Leu - Ser - Asp - Gly - Thr - Val - Val - Lys -
C-1027	Ala - Pro - Ala - Phe - Ser - Val - Ser - Pro - Ala - Ser - Gly - Leu - Ser - Asp - Gly - Gln - Ser - Val - Ser -
AXN	Ala - Pro - Ala - Phe - Ser - Val - Ser - Pro - Ala - Ser - Gly - Val - Ser - Asp - Gly - Gln - Ser - Val - Ser -

Val - Ala - Gly - Ala - Gly - Leu - Gln - Ala - Gly - Thr - Ala - Tyr - Asp - Val - Gly - Gln - Cys - Ala - Trp - Val -
Val - Ser - Val - Ser - Gly - Ala - Ala - Ala - Gly - Gln - Thr - Tyr - Tyr - Ile - Ala - Gln - Cys - Ala - Pro - Val -
Val - Ser - Val - Ala - Ala - Ala - Gly - Gln - Thr - Tyr - Tyr - Ile - Ala - Gln - Cys - Ala - Pro - Val -

Asn - Thr - Gly - Val - Leu - Ala - Cys - Asp - Pro - Ala - Asn - Phe - Ser - Ser - Val - Thr - Ala - Asp - Ala - Asp -
Gly - Gly - Gln - Asp - Ala - Cys - Asn - Pro - Ala - Thr - Ala - Thr - Ser - Phe - Thr - Thr - Asp - Ala - Ser -
Gly - Gly - Gln - Asp - Ala - Cys - Asn - Pro - Ala - Thr - Ala - Thr - Ser - Phe - Thr - Thr - Asp - Ala - Ser -

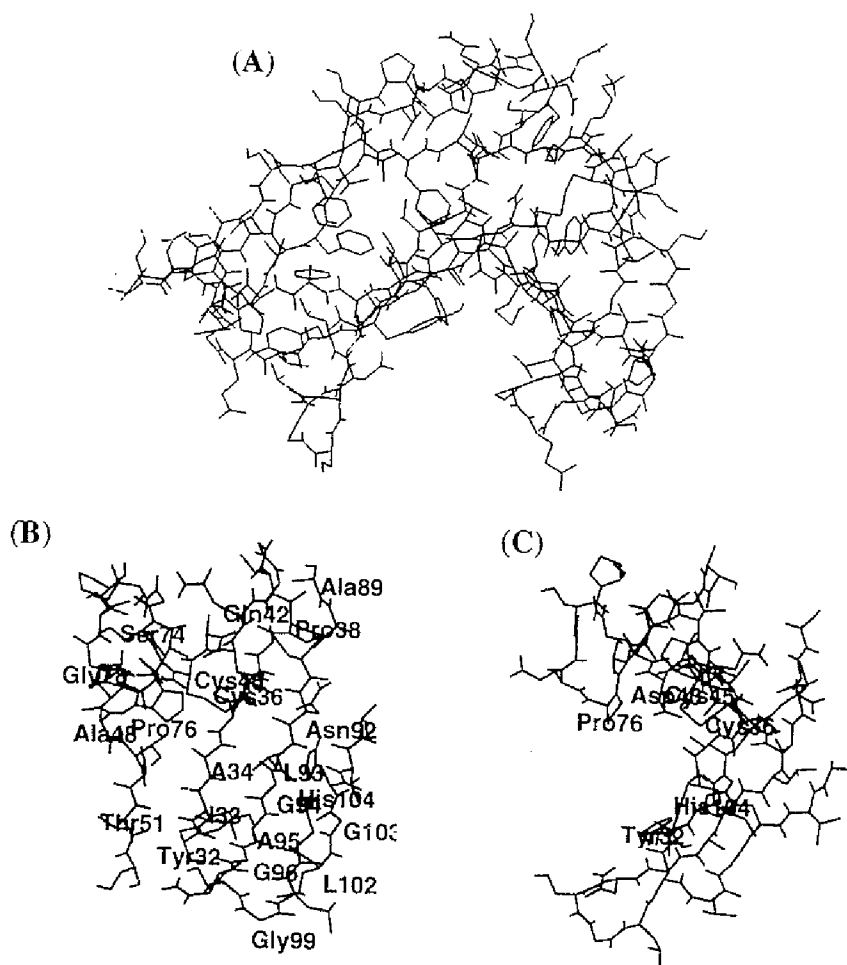
Gly - Ser - Ala - Ser - Thr - Ser - Leu - Thr - Val - Arg - Arg - Ser - Phe - Gln - Gly - Phe - Leu - Phe - Asp - Gly -
Gly - Ala - Ala - Ser - Phe - Ser - Phe - Val - Val - Arg - Lys - Ser - Tyr - Thr - Gly - Ser - Thr - Pro - Gln - Gly -
Gly - Ala - Ala - Ser - Phe - Ser - Phe - Thr - Val - Arg - Lys - Ser - Tyr - Ala - Gly - Gln - Thr - Pro - Ser - Gly -

Thr - Arg - Trp - Gly - Thr - Val - Asn - Cys - Thr - Thr - Ala - Ala - Cys - Gln - Val - Gly - Leu - Ser - Asp - Ala -
Thr - Pro - Val - Gly - Ser - Val - Asp - Cys - Ala - Thr - Ala - Ala - Cys - Asn - Leu - Gly - Ala - Gly - Asn - Ser -
Thr - Pro - Val - Gly - Ser - Val - Asp - Cys - Ala - Thr - Ala - Ala - Cys - Asn - Leu - Gly - Ala - Gly - Asp - Ser -

Ala - Gly - Asp - Gly - Gln - Pro - Gly - Val - Ala - Ile - Ser - Phe - Asn -
Gly - Leu - Asp - Leu - Gly - His - Val - Ala - Leu - Thr - Phe - Gly -
Gly - Leu - Asn - Leu - Gly - His - Val - Ala - Leu - Thr - Phe - Gly -

113 a.a. residues
110 a.a. residues
108 a.a. residues

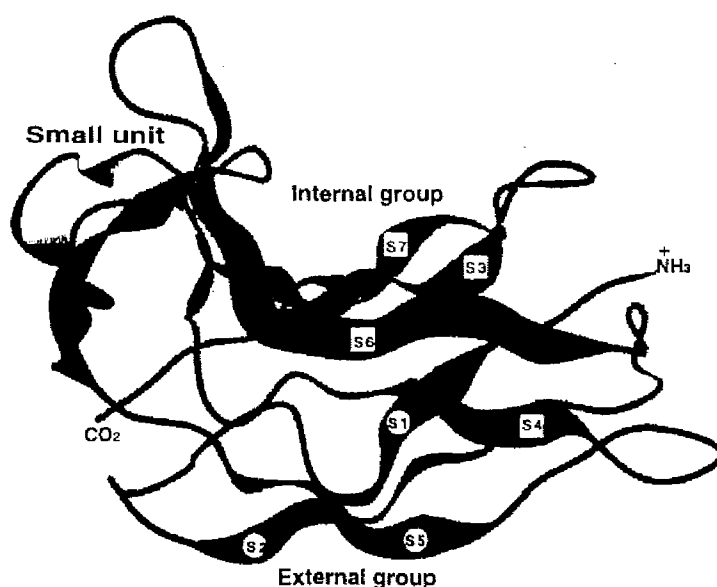
(Figure2-1) Amino acid sequences of neocarzinostatin (NCS), C-1027, actinoxanthin (AXN).



(Figure2-2) The whole structure (A) and the binding pockets [(B) and (C)] of C-1027 apoprotein models.

C1027-Apoの3次構造はChr結合ポケットを形成する2つの異なる大きさの単位構造からなっている。大きい方の単位構造は、平たい筒型をしており、外部グループと内部グループの2種類の逆平行シート群からなる。この外部グループはS1 (Ser4 - Pro8), S2 (Ser17 - Val22), S5 (Phe63 - Arg68)と3つの β 鎖からなり、内部グループはS3 (Thr30 - Val39), S4 (Ser52 - Asp56), S6 (Asn92 - Asn97), S7 (His104 - Ala106)の4つの β 鎖からなっている。Apoのポケットの底は、この内部グループの4つの β シートから形成されたものである。一方、ポケットを形成する小さい方の単位構造は、s1 (Cys36 - Pro47), s2 (Ser70 - Ser74), s3 (Gly82 - Asp85)の3つの逆 β シートからなり、ポケットの側面を形作っている。(Figure2-3)

ポケットはTyr32-Ser52, Thr72-Pro80, Ala89-Ala106から形成されているが、特に注目すべき点は、AXNとは異なるC-1027固有の7つのアミノ酸残基のうちThr72, Ser74, Glu77, Ala89, Asp101の5つの残基がポケット形成残基であり、これら5つの残基はC1027-ChrのC1027-Apoへの特異的結合に重要な役割を果たしているかもしれない。また、ポケットの奥底には疎水性残基群 Ile33- Ala34, Leu93-Gly96, Leu102-Gly103が存在しておりChrとの疎水性相互作用に寄与している可能性がある。



(Figure2-3) Ribbon presentation of Apo-C1027. The letters (S3,S4,S6,S7) and (S1,S2,S5) surrounded by square and circle show internal sheet and external sheet, respectively. The other sheets constitute the small unit.

2、C-1027のApoとChrとの複合体形成

アポタンパク質の役割、性質

Apoは、すでに研究されている抗腫瘍性抗生物質ネオカルチノスタチン (NCS) と同様に⁵⁸、活性保護しながら標的部位にChrを運搬するキャリアーとして働くものと考えられている。

そこでApoのキャリアーとしての性質を説明するために、単独ChrとApo - Chr複合体との両者によるDNA鎖切断実験を行った。Figure2-4に示すように複合体状態のままで反応させたDNA切断パターンと単独Chrを反応させたパターンは著しく類似していた。また、DNaseIフットプリント実験よりDNAフラグメントとApoとの相互作用は観測されなかったことから、C1027-ApoはDNA切断および配列特異性に影響していないものと考えられる。

次にApoの保護特性を検討するために、Chr - Apo複合体とChr単独状態との2種類について、0~180分37℃でプレインキュベーションした後のDNA切断活性を比較した。Figure2-5 およびTable2-1に示すように、単独Chrは60分間のプレインキュベーションによりDNA切断能がほとんど失われたのに対し、Chr - Apo複合体状態では180分間インキュベーションの後でさえも十分なDNA切断活性を保持していた。このようにC-1027のApoは、Chrを包含することにより、その不活性化を防ぎ、保護していることが立証された。

C1027-ChrのApo選択特異的 1 : 1 結合

C1027-Chrは、芳香環を有することから320nmで励起した時、蛍光を発する。そこで、C1027-Chr溶液にApoを徐々に加えていった際の蛍光スペクトルの変化を追った。Apoの濃度が増加するにつれて、Emピーク($\lambda_{\text{max}}=440\text{nm}$)は低波長側(420 nm)にシフトし、蛍光強度も増大した。さらにmolar ratio法から、ChrとApoは1 : 1結合をしていることが示唆された。(Figure2-6)

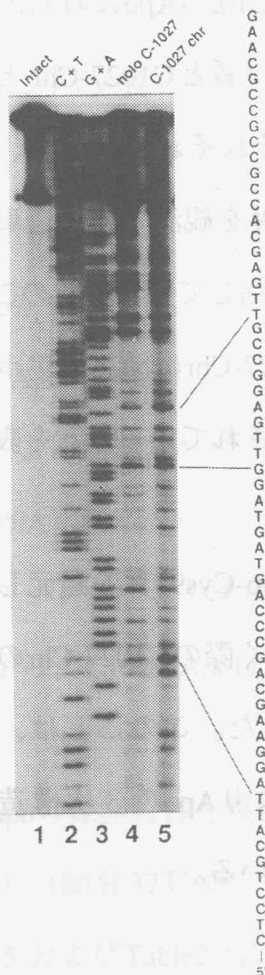
一方、C1027-Apoの代わりにNCSのアポタンパク質やアルブミンを添加した場合、こ

のような蛍光変化が見られなかったことから、C1027-Chr はC1027-Apoに特異的 1 : 1 結合しているものと考えられる。さらに、NCSのアポタンパク質とC1027-Chr との混合溶液およびC1027-ApoとNCSのクロモフォアとの混合溶液のそれぞれについて、プレインキュベーション後におけるそれぞれのクロモフォアの反応性を観測すると、単独のクロモフォアの時と同様にC1027-Chr, NCSクロモフォアともに失活していた。このことは、C1027-Apoが他のリガンドを取り込まれないこと、さらにC1027-ChrはNCSのアポタンパク質に取り込まれずにC1027-Apoに選択的に取り込まれて保護されていることを表わし、C-1027のApoとChrとの選択特異的結合を示している。

また、Apo内の2つのジスルフィド結合 (Cys36-Cys45, Cys86-Cys91) を還元し3次構造の破壊を施した還元型ApoにC1027-Chrを徐々に添加していく際のC1027-Chrの蛍光変化を測定したところ、ほんのわずかな変化しか見られなかった。このことは、還元型ApoにはChrがほとんど取り込まれず、ジスルフィド結合によりApoの3次構造保持がChrの認識、結合に重要な役割を果たしていることを示唆している。

C-1027の円二色性(CD)スペクトル測定

Apo, Chr, および Apo-Chr複合体 (Holo)それぞれについて、CD測定を行った。Figure2-7に示すように、Apoは2つの負のコットンピーク (256, 293 nm)と1つの正のコットンピーク (286 nm)を表し、Chrは240nmに負のコットンピークと338nmにブロードな負のコットンピークを示した。一方、Holoは256, 308, 378nmと3つの負のコットンピークを持ち、明らかにApo, Chr単独のCDスペクトルやApoとChrの総和スペクトルとは異なるスペクトルが得られた。このことから、C-1027のApoとChrは、複合体形成により、互いに何らかのコンフォメーション変化を起こしていることが推測される。また、単独Chrの338nmの広幅化したピークはBO環由来のものと考えられ (なぜなら、BO環は350nm付近に吸収ピークを持つことが知られている⁵⁹⁾、Holo状態におけるこのピークのシフト変化は、BO環がChr-Apo相互作用において重要な役割を演じていることを示唆している。

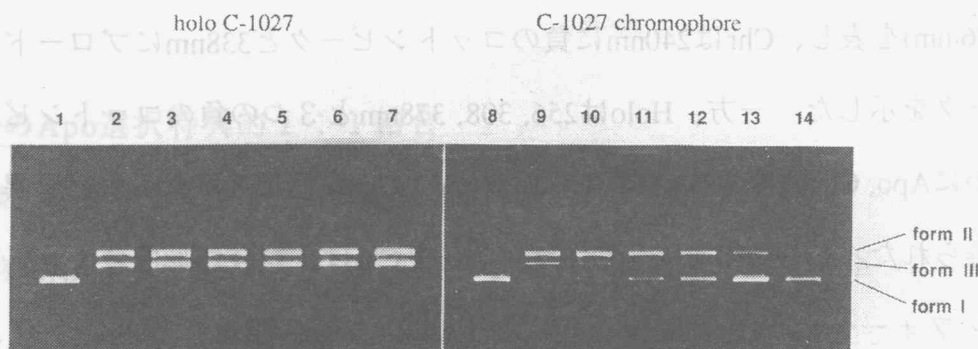


(Figure2-4) Comparison of sequence-specificity in DNA cleavages by holo C-1027 and C-1027 chromophore alone. Lanes 4 and 5 represent holo C-1027- and C-1027 chromophore-induced DNA cleavages, respectively. Lanes 1 - 3 show intact DNA, C + T, and G + A of the Maxam-Gilbert sequencing reactions, respectively.

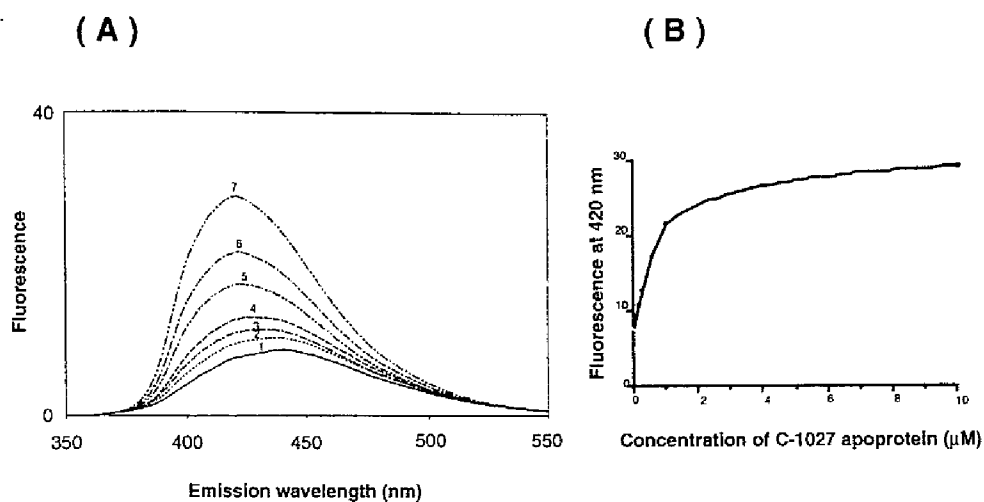
(Table2-1) Inactivation of Holo C-1027 and Its Chromophore Alone^α

Incubation Time (min)	Chromophore			Holo C-1027		
	form I	form II	form III	form I	form II	form III
intact	79.3	20.7	0	79.3	20.7	0
0	3.8	60.4	35.8	4.0	61.2	34.8
10	20.8	56.6	22.6	3.7	60.6	35.7
30	31.5	51.1	17.4	3.8	61.3	34.9
60	43.4	45.4	11.2	4.0	60.5	35.5
120	65.7	31.8	2.5	4.2	59.8	36.0
180	73.6	24.7	1.7	4.5	59.0	36.5

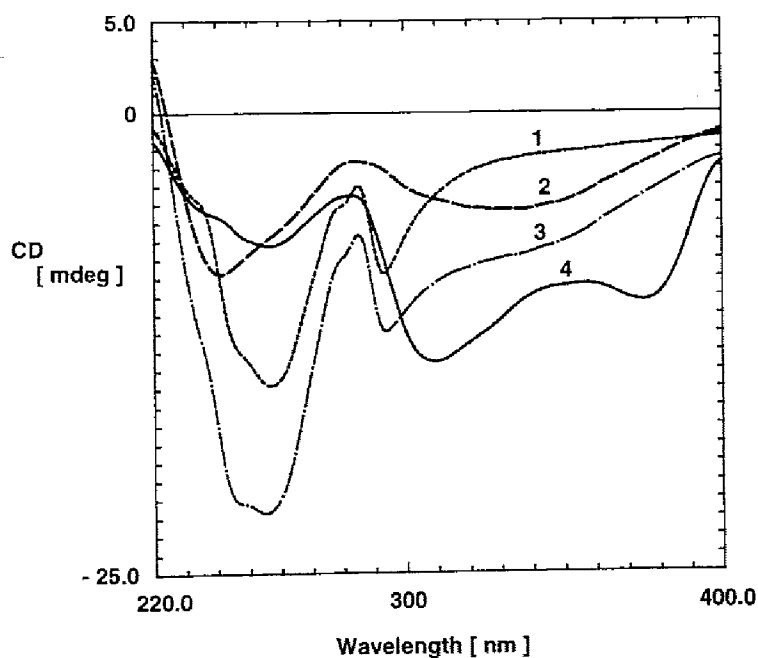
^αAfter the respective incubation time, the DNA cleavage activity of the samples was investigated at 37 °C and pH 7.5 for 10 min.



(Figure2-5) Effect of preincubation on DNA cleaving activity of holo C-1027 (lanes 1-7) or C-1027 chromophore (lanes 8-14). Holo C-1027 and C-1027 chromophore were preincubated at 37 °C for 10 min (3, 10), 30 min (4, 11), 60 min (5, 12), 120 min (6, 13), and 180 min (7, 14). Then, each sample was incubated with supercoiled pBR 322 DNA at 37 °C for 10 min. Lanes 2 and 9 show DNA cleaving activities at 37 °C for 10 min of holo C-1027 and C-1027 chromophore, respectively. Lanes 1 and 8 are intact DNA.



(Figure2-6) Effect of C-1027 apoprotein on C-1027 chromophore fluorescence. (A) Changes in fluorescence emission spectra of C-1027 chromophore (10 μM) by addition of C-1027 apoprotein. Spectrum 1 shows chromophore alone. The apoprotein was added to the chromophore solution at 0.1 μM (2), 0.2 μM (3), 0.3 μM (4), 0.6 μM (5), 1.0 μM (6), and 10 μM (7). Emission band-pass value was 5 nm. (B) Magnitude of the fluorescence at 420 nm as a function of the apoprotein concentration.



(Figure2-7) CD spectral changes of C-1027. Lines 1, 2, and 4 show the spectra of C-1027 apoprotein, C-1027 chromophore, and holo C-1027, respectively. Line 3 indicates the sum of spectra of the apoprotein and the chromophore .

3、C-1027のApo-Chr複合体モデルとApo-Chr相互作用様式

経験的分子力場計算によるC1027Apo-Chr複合体モデル

一般に分子どうしが結合する時、それぞれの分子のvan der Waalsポテンシャルエネルギーや静電ポテンシャルエネルギーを出来るだけ低くするように、相補的に結合することが知られている⁶⁰⁻⁶³。そこで著者は、C-1027のApoとChrのvan der Waalsポテンシャル、静電ポテンシャルに基づいて、複合体モデルの構築を試みた⁶⁴⁻⁷⁰。

Chr分子全体を用いてApoポケットとのvan der Waals, 静電相互作用を全結合パターンについて評価することは計算機の能力上不可能である。そこでChrを構成する特定のプローブ原子、C11, C12, Cl, O4, N1, MeOについて、van der Waals エネルギー、静電エネルギーの総和が最小になる最適部位をQUANTA / CHARMMソフトウェアのProbe interaction calculationツールを用いて探究した。結果をTable2-2に示す。

(Table2-2) Favored binding sites and empirical energy values
for each probe atom of C1027-Chr.

Probe	Energy(kcal/mol)	Residues (forming favored binding sites)
<u>AEB moiety</u>		
carbon atom of C11 or C12	-3	Asn46 Pro47 Pro76 Glu77
	-3	Ala34 Leu93 Gly94
chloro group	42	Tyr32 ala34 Ala50 Gly94
<u>BO ring</u>		
ring oxygen	35	Asn92 His104 Val105 Ala106
ring nitrogen	35	Asn92 His104 Val105 Ala106
methoxyl carbon	-28	Cys36 Asp43 Asn92 His104
	-28	Gly94 Ala95 Asp101 His104

さらにChr分子全体のApoポケット内での配向を決定するために、Apoの結合部位とChrのBOおよびエンジンコア部分(AEBとMC部分)に関して静電ポテンシャル表面を計算し、それぞれのポテンシャル分布を色調の変化によって表した。(FigureC-4: 赤色が正、青色が負のポテンシャルを示す。) 分子どうしの結合の際、静電相互作用エネルギーが出来る限り小さくなるように結合する方が安定であるので、Chrの青色部分はApoの赤色部分に、Chrの赤色部分はApoの青色部分に接近するようにChrのBO部分とエンジンコア部分の配向を決定した。すなわち、Table2-2のプロープ原子の最適部位への配置を考慮しながら、エンジンコアに関しては、p1, n1がそれぞれApoのn3, p3に重なるように、BOに関してはp2, n2がそれぞれApoのn3, p4に重なるような配向で決定された。(FigureC-4)

一方、AS部分は、アミノ基、水酸基などを持つことから親水性が高いので、エンジンコアから見てApoのポケットの外側に向くように、エンジンの9位炭素に連結したところ、Apoのポケットの蓋のような役割をしてることが示唆された。(FigureC-5)

NMR構造解析によるC1027Apo-Chr複合体モデル

FigureC-6は、サントリー生有研・石黒博士より、親切にも座標データを提供して頂いた⁷¹。モデルからChrはApoの疎水性ポケット内でBOとAS部分をコンパクトに折りたたむことによって、包含されていることがわかる。

BO部分はポケットの奥底のTyr32 - Ser52からなる β 鎖に位置し、Ser74 - Thr79からなる β ターンによって覆われている。周辺残基との距離から水素結合、塩橋などの強い相互作用は考えられず、疎水性相互作用で安定化しているものと予想される。このことは、上記CD測定の結果とよく一致するものである。

また、フェノール環を含む大環状部分もポケットの底に位置し、Ala34, Gly94, Cys36-Cys45とのvan der Waals相互作用や、Chr-17NH₂とHis104との水素結合、Asp43やAsp101との塩橋などの相互作用によって強く安定化されているものと考えられる。

そして活性種であるエンジン環はポケットの中央に位置し、Apoとほとんど相互作用

用していないように思われる。特定の相互作用は見られないが、エンジン環はTyr32, Ala95, Pro96, Ala97などの残基に囲まれて、水素源の攻撃から保護されているものと思われる。さらにエンジン環の片面には分子内クロロフェノール環が位置し、反対側の面にはBO部分とAS部分が位置し、エンジン環はApoポケット内部で両者に挟まれるようにして、水素源からの攻撃を強力に防御しているものと考えられる。唯一接近しているTyr32は、エンジン環との π - π スタッキングによるエンジンの安定化に寄与しているかもしれない。

AS部分はApoとほとんど相互作用を示さず、ポケットの入口に位置し、水素源の侵入を防ぐ蓋のような役割を果たしているものと考えられる。

NMRモデルと力場モデルとの比較

経験的力場計算を用いたモデルとNMRに基づくモデルとを比較すると、Apo内におけるBO環の位置が完全に異なっていた。もちろん、NOE距離拘束分子動力学計算によって求められたNMRモデルの方が、より正確であるといえる。そこで、力場モデルにおける問題点を考察する。Chrの特定プローブ原子を用いてのvan der Waals、および静電相互作用の評価について、特定原子を用いざるを得なかったためChr分子全体のvan der Waals相互作用を評価したわけではなく、この点で不十分であったものと思われる。特に、BO部分は、（上記のNMR構造が示すように）ポケットの奥深くに存在し、ポケットとの疎水性相互作用の寄与が大きいものと思われ、van der Waals相互作用の正確な算出が出来ないという本方法の弱点による影響を大きく受けたものと思われる。

一方、上記のNMRモデルを静電ポテンシャル表示したところ、ApoとChrそれぞれの部分のポテンシャル強度の相補的なマッチングが非常に良いことから、静電ポテンシャルに基づく複合体構築は有力な手段と考えられる。実際に、経験的力場モデルのエンジンコアおよびそれに結合するAS部分のポケット内での配置はNMR構造モデルとはほぼ類似した配置を示した。

第三章

アポタンパク質結合状態およびDNA結合状態における

抗腫瘍活性種C-1027クロモフォアの

動的構造変化と反応メカニズム

C-1027のクロモフォア(Chr)は単独では非常に不安定であり、反応開始に還元剤を必要とする他のエンジイン系化合物とは異なり、還元剤の非存在下においても反応が自発的に開始される⁹。そこで、C-1027のChrはアポタンパク質(Apo)のポケット内に包含されることにより安定化されている。一方、他のエンジイン化合物ではエンジイン骨格が還元剤による攻撃を受けることで骨格内の拘束エネルギーが放出され、その結果エンジイン骨格内の三重結合両端の原子間距離が接近し^{72,73}バグマン環化反応が進行する。つまり還元剤による攻撃がバグマン反応の直接的な引き金（トリガー）であると考えられる。（例えば、同じクロモプロテイン系化合物のネオカルチノスタチンもアポタンパク質とクロモフォアの複合体として存在しているが、そのエンジインクロモフォアの反応性は還元剤によって直接的に制御されており、アポタンパク質による安定化が反応性の制御に直結していない^{30,32,74}。）それ故に、「C1027-Chrは本当にApoのみで反応性が制御されているのであろうか？」また「C1027-Chr反応性の還元剤に代わる制御因子が存在するのであろうか？」という疑問が生じてくる。そこで本章において、C1027-Chrの存在状態と反応性との相関に着目し、DNAに結合するChr、Apoに結合するChr、単独で存在するChrの3構造変化を追跡することにより、「如何にして、C1027-ChrはApo内で安定化され、DNAと結合することにより活性化するのか？」というC-1027反応制御メカニズムの根本原因の解明を試みた。

1、C-1027クロモフォアによる多分子認識様式

FigureC-7 および Table3-1 に C1027-Chr の DNA と Apo の 認 識 様 式 を ま と め た。

ChrのDNA認識には、主にBO, AS部分が重要な役割を果たしているのに対し、MC部分はDNAとの相互作用が見られなかった。一方、ChrのApo認識には、主にBO, MC部分が重要な役割を果たしているのに対し、AS部分はApoとほとんど相互作用していなかった。このように、ゲスト分子であるChrはホスト分子の種類（DNAあるいはApo）によって自らのパーツを巧みに使い分けて多分子認識を可能にしている。また、Chrは、DNA結合の際にDNAをつかむ両手の役割をしていたBO, AS部分を、Apo結合の際には折りたたむことによりコンパクトに小さくなりApoのポケット内にうまく納まっていた。したがって、Chrは2種類のホスト分子の結合部位の形状にあわせて、その形を誘導適合しているものと考えられる。またChrの活性種であるエンジン環の配向を比較すると、DNA内ではマイナーグループに対し水平に存在し、Apo内ではポケットの底壁に対して垂直に配向している。これはエンジン環は、DNAのマイナーグループとは直接接触し水素引き抜きが出来るのに対し、Apoのポケット内ではアミノ酸残基とほとんど相互作用せず、安定に保たれていることを示唆している。このように、Chrはホスト分子（DNA, Apo）の種類に応じた異なる2種類の結合様式を有しており、この結合様式の違いは水素引き抜き反応を演じるエンジンの活性とも密接に関係している。

(Table3-1) Recognition modes of functional moieties of C1027-Chr bound to DNA and Apo

	To DNA	To Apo
Benzoxazolinale	Intercalation (π - π stacking) at the d(C3C4)/d(G11G12) step	Hydrophobic interaction with β -strand of the bottom of the pocket (van der Waals)
Aminosugar	Minor groove floor binding (hydrogen bond, van der Waals) Backbone helical binding (van der Waals) with the d(A5T6)/d(A9T10G11)	No interaction covering over the pocket
Macrocyclic ring	No interaction	Bured and fixed at the bottom of the pocket (hydrophobic int., hydrogen bond, salt-bridge)
AEB	Backbone helical binding with the d(C4A5T6) (van der Waals)	Little interaction in the center of the hole (stacking interaction with Tyr32)

2、C-1027クロモフォアの構造変化と反応性

Free Chrの溶液構造

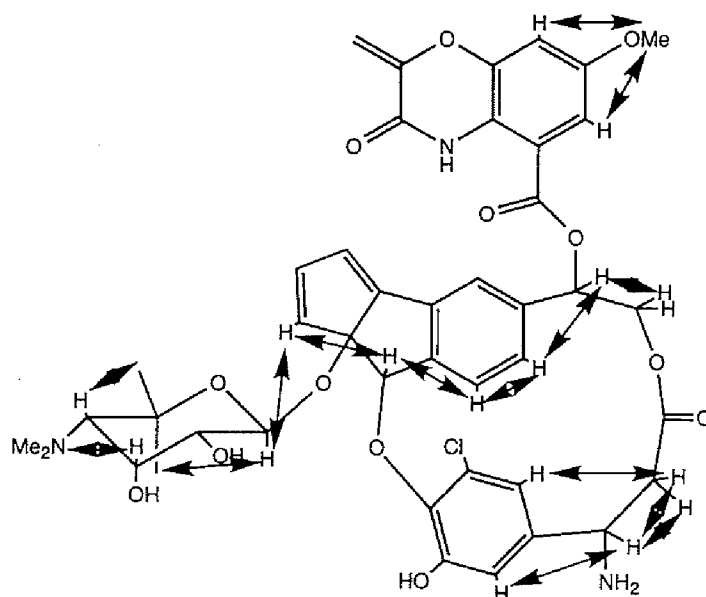
単独ChrにおけるROESY実験から14個の分子内ROEが観測された (Figure3-1)。これらのROE距離情報に基づいて、距離拘束分子動力学シミュレーションの結果 (FigureC-8)、溶液中の単独ChrはBOとASを特定のコンフォメーションに固定せず、自由に動かしていることが示された。これは、BO、AS部分の分子内ROEがほとんど観測されなかったこととも一致している。一方、観測された分子内ROEのほとんどが16員環MC部分内であることから、単独ChrにおけるMC部分の構造は比較的特定化されたものといえる。分子動力学計算の最終4psの時間内に発生した8個の単独Chr構造における平均 pairwiseRMSD値は0.77 Åであった。

三状態の重ね合せと比較

Apo結合状態、DNA結合状態、溶液溶解状態の3つのChrの平均最適化構造を、エンジン環を基準に重ね合わせた。(FigureC-9)

BO部分とAS部分は予想されたように全く重なりを示さなかった。上述したように、DNA結合状態のChrはBO部分とAS部分を開いた構造であるのに対し、Apo結合状態のChrはこれらの部分を互いに近づけて折り畳んでいる。したがって、BO、AS部分はホストとの結合時の誘導適合のため重なりを示さないものと考えられる。[FigureC-9 (A)]

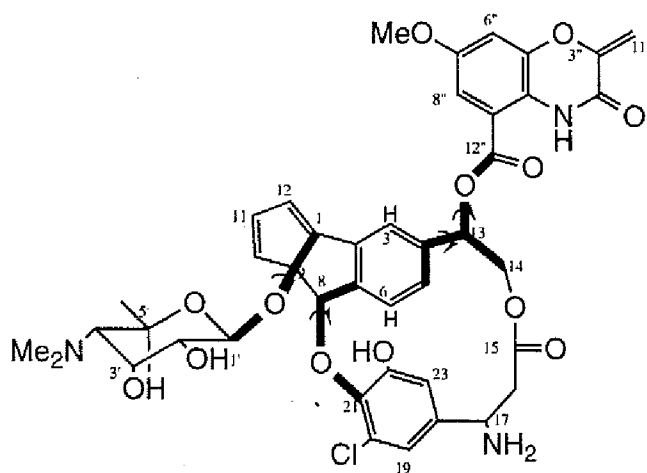
一方、16員環MC部分については、DNA結合状態とApo結合状態の間ではっきりとしたズレが確認された [FigureC-9 (B)]。Table3-2が示すとおりDNA結合状態とApo結合状態との間のエンジン環とMC部分の連結部分の2面角の差は 30 ± 2.5 度であった。また、Chr単独状態におけるMC部分のコンフォメーションはDNA結合状態に極めて近い状態であった。



(Figure3-1) Intramolecular ROEs of C1027-Chr.
The arrows shows intra-ROEs.

(Table3-2) Characteristic dihedral angles (deg) of C1027-Chr
bound to DNA or Apo, and free Chr

	In DNA	In Apo	Free
Benzoxazolinone (C4)(C13)(O)(C12'')	-136.4	67.84	-109.7
Aminosugar (C1)(C9)(O)(C1')	-50.55	-31.31	-10.29
Macrocyclic ring (C5)(C4)(C13)(C14)	-79.41	-106.9	-89.40
(C7)(C8)(O)(C21)	-21.94	10.34	-15.75

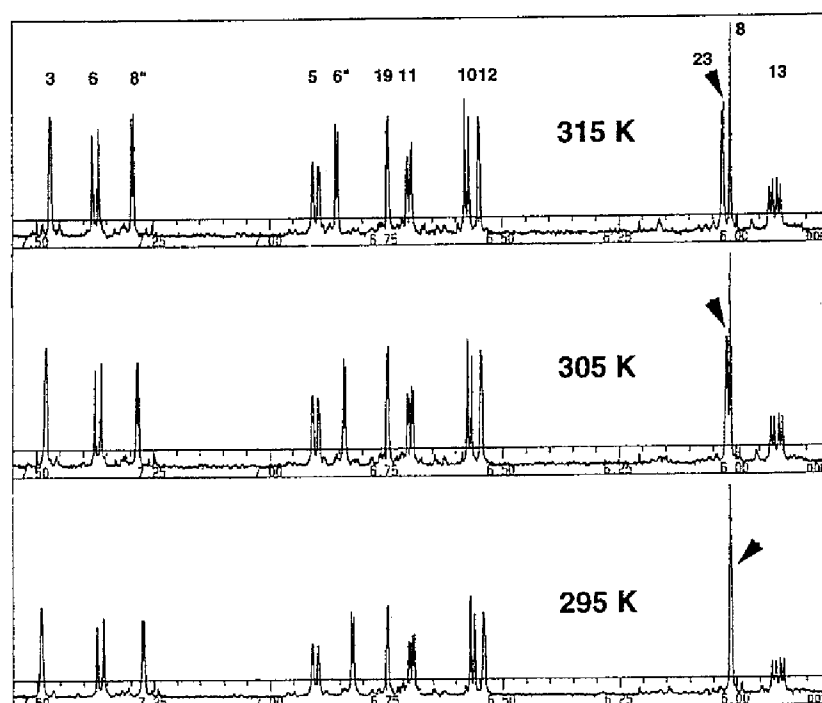


動的構造変化から反応制御部分の予測

以前に行われた不活性化実験より、C1027-ChrはDNA非存在下に比べてDNA存在下の方がより不活性化しやすく（反応性が高く）、さらにApo内で最も安定に存在していた。つまり、Chrの反応性はDNA結合状態>溶液溶解単独状態>>Apo結合状態であるといえる⁹。さらに、当研究室のこれまでの実験から、C-1027の反応性は温度に依存しており37℃以上で急激に反応性が上昇することが示された。これらの点から、著者はC1027-Chrの反応性はただ単にApoによる保護が原因であるだけでなく、Chr自身のコンフォメーション変化も反応性の制御に大きく影響しているものと予想した。すなわち、DNA結合状態のChrはより活性の高いコンフォメーションをしており、Apo結合状態では反応性の低いコンフォメーションをしていると仮定し、その証明を試みた。

ここで、単独Chrの分子動力学シミュレーション実験の結果から、BO, AS部分は様々なコンフォメーション変化をしており、これらBO, AS部分の変化が反応性制御に関わっているとは考えられない。(FigureC-8)

さらに、Chrのコンフォメーションの温度依存性を観測するために、295 Kから315 Kまでの温度における1D-¹H-NMR測定を行った (Figure3-2)。その結果、温度上昇に伴いChrの分子内クロロフェノールの23位のプロトンのみが、唯一高磁場側にシフトし、他のプロトンは全くシフト変化しなかった。この23位プロトンのシフト変化は、エンジン環の環電流の影響を強く受ける23位プロトンが温度上昇により位置を変化させたこと、すなわちクロロフェノール環の立体配座が変化していることを示している。したがって、Chrの反応性の温度依存性と関連づけると、温度変化によりクロロフェノール環のコンフォメーションが変化しChrの反応性に影響を与えているものと考えられる。つまり、クロロフェノール環とエンジン環の空間的配置がChrの反応性の自己制御に影響しているかもしれない。確かに、ChrのMC部分はDNA結合理型、Apo結合理型、さらには単独Chr状態で異なるコンフォメーションを示しており、DNA結合理型では反応性の高い配座をし、Apo結合理型では反応性の低い配座をしているものと予想される。



(Figure3-2) 1D ¹H NMR spectra (5.8-7.55 ppm) of free Chr at different temperatures from 295 K to 315 K. The arrows show H23 proton chemical shift perturbation

MC部分構造の違いが生じる原因

このC1027-Chrの反応性に重要な役割を演じるMC構造の違いは、以下のようにDNAとApoとの結合様式の違いに起因している。(FigureC-7)

Apoのポケット内では、MC環はポケットの底に位置し、ポケット内のアミノ酸残基とvan der Waals相互作用、水素結合、塩橋を通して強く相互作用し固定化されている。特に、ApoのAsn92 - Ala106からなるβシートの壁によりクロロフェノール環はポケットの内側に押し込まれている。一方、Apo内とは対照的に、MC部分はDNAとほとんど相互作用が見られない。(分子間NOEもほとんど観測されていない。)

ビラジカル状態の反応性がC1027-Chrの反応性に大きく影響する

東北大、平間博士らの報告により、C1027-Chrの9員環に内在する拘束エネルギーがエンジン型とビラジカル型との内部変換におけるエネルギー障壁を低下させる可能性が示唆された。(実際、Apo内のChrにおける電子スピン共鳴が観測されている。)した

がって、C1027-Chrにおいて、エンジン \leftrightarrow ビラジカル変換が可逆反応であるため (Figure1-1)、ビラジカルによる水素引き抜き段階の速度論的反応性が、C1027-Chr全体の反応性に最も大きな影響を及ぼす⁴⁰。したがってMC部分のコンフォメーション変化がビラジカルの反応性に与える影響を観測すればC1027-Chrの反応性への寄与が予測される。

分子軌道計算による裏付け

Chenらの最近の研究⁷⁵により、p-ビラジカルの反応性は、一重項基底状態と三重項励起状態との間のエネルギースピリッティング（ギャップ）の大きさに依存していることが示された。すなわち、スピリッティングが大きければ大きい程、ビラジカルの反応性は低いものと言える。

そこで筆者は、*Ab initio*分子軌道計算⁷⁶⁻⁷⁷により、クロロフェノールを想定した近接芳香環の空間的配座がビラジカル反応性に与える影響を評価した。C1027-Chrのビラジカル部分とクロロフェノール部分そのものを使用する代わりに、それぞれパラ-ベンジン型-ビラジカル環とベンゼン環を用いた系で計算を行った。すなわち、2つの状態 (DNA結合状態、Apo結合状態) におけるC1027-Chrのビラジカル部分とクロロフェノール部分の座標に、パラ-ベンジン型-ビラジカル環とベンゼン環とをそれぞれ重ね合わせることにより、Apo内、DNA内それぞれにおけるクロモフォアのビラジカル環とクロロフェノール環と同じ空間的配置をもつビラジカル-ベンゼン環系を計算に用いた。また、計算はBPW91/cc-pVTZ およびCCSD(T)/cc-pVTZの2種類の方法で行われた。Table3-3に示すようにDNA内のビラジカル系のS-TスピリッティングはApo内のスピリッティングよりも小さいことがわかる。したがってC1027-Chrのビラジカルはクロロフェノールを含むMC部分のコンフォメーションを変化させることにより、Apo内よりもDNA内の方が反応性が高くなっていることが示唆される。したがって、C1027-Chrは分子内クロロフェノール環の微妙な構造変化によって、反応性を自己制御していることが分子軌道計算から立証された。

(Table3-3) Computed total energies, zero-point energies, and S-T splittings
for biradical-aromatic ring systems in Apo and DNA

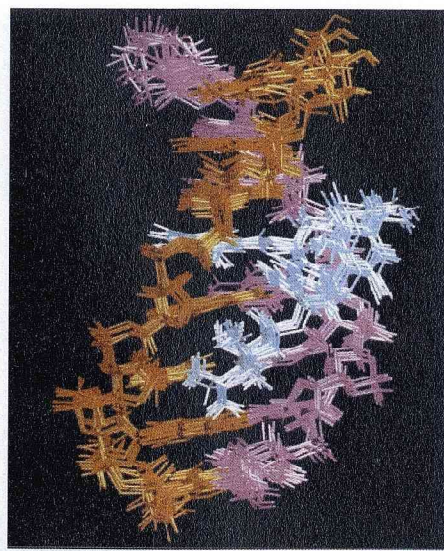
	CCSD(T)/pVTZ	BPW91/pVTZ	ZPE
In Apo			
triplet	-460.2375522	-463.2012796	107.0864691
singlet	-460.1084965	-463.1971597	105.7723144
S-T splitting	1.1850990	1.3100348	
In DNA			
triplet	-460.2296099	-463.1959909	107.3332236
singlet	-460.0998565	-463.1911972	106.0589484
S-T splitting	1.1445218	1.2694815	

* S-T splitting = ($E_{\text{tot}} + \text{ZPE}$)_{triplet} - ($E_{\text{tot}} + \text{ZPE}$)_{singlet}

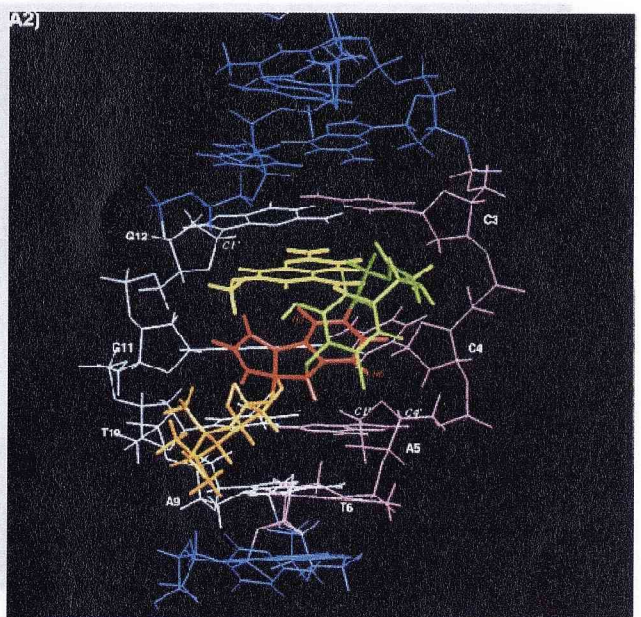
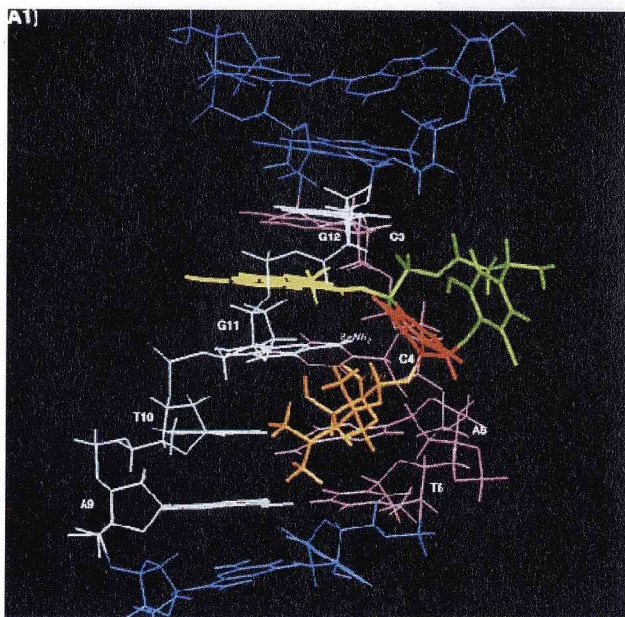
* Total energies in au; zero-point energies and S-T splittings in kcal/mol

3、クロモプロテインC-1027の反応メカニズム

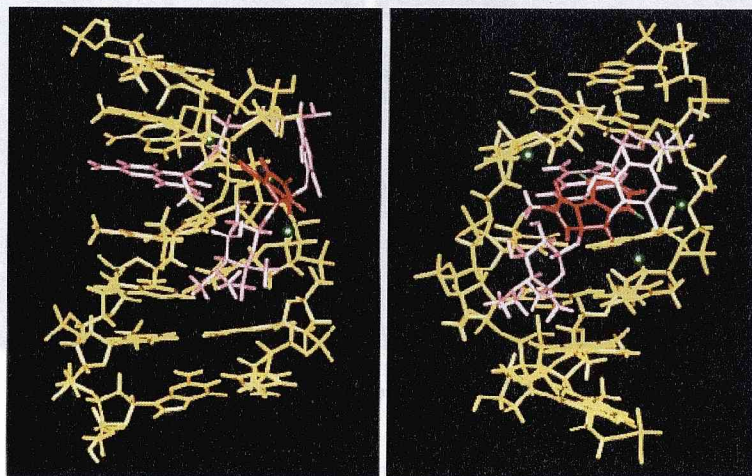
これまでの結果より、クロモプロテインC-1027の反応メカニズムが以下のようにまとめられる。C1027-ChrはC1027-Apoに結合されることにより、次の4つの要因によって安定化されている。1) Apoのポケット内の疎水性環境下による水素源の回避、2) エンジン環とTyr32との π -スタッキング相互作用、3) Chr分子内のクロロフェノール環、ベンゾオキサゾリン環、アミノ糖部分がエンジン環を包囲することによる水素源攻撃からの防御、および4) ポケット内における16員環MC部分の立体的拘束によるクロロフェノール環とエンジン環との接近によるS-Tエネルギーギャップの拡大、である。Apoから放出されたChrはポケット内におけるMC部分の立体的拘束から解放され活性型に変化する。そして、DNAに結合することにより、Apo内で折り畳んでいたベンゾオキサゾリン環、アミノ糖部分を開き、攻撃種であるエンジン-ビラジカル部分をDNAのマイナーグループにさらすことになる。それと同時にビラジカル種がDNAの炭素鎖の水素と接近しており、その水素を引き抜くことによりDNA切断が進行する。



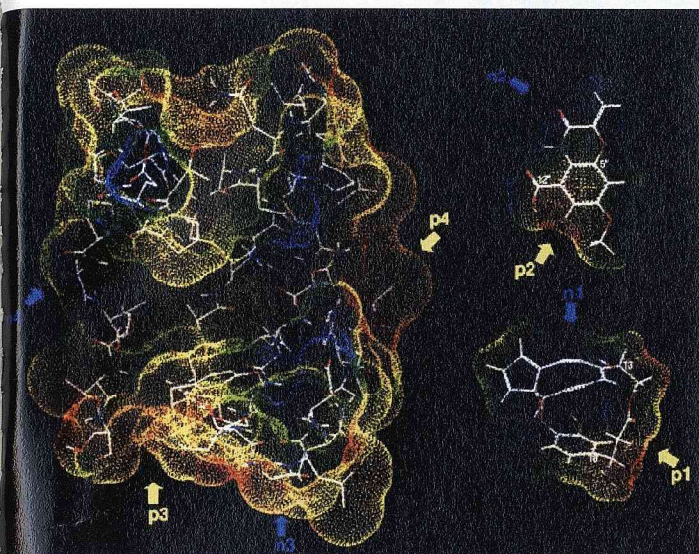
(Figure C-1) Eight superposed distance-refined solution structures of DNA-Chr complex.



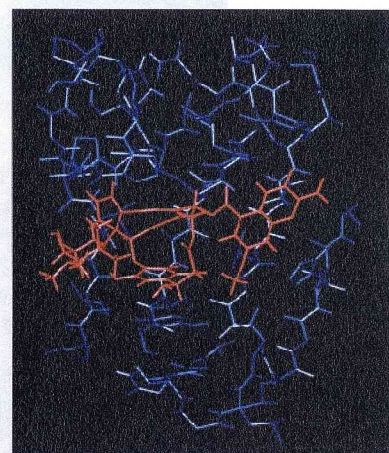
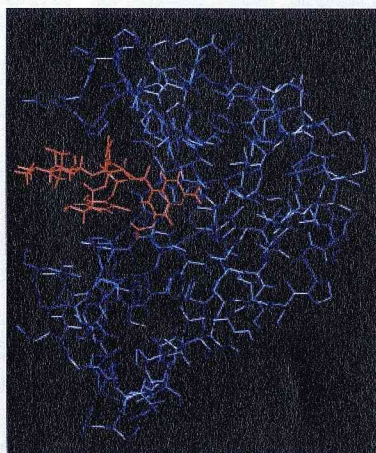
(Figure C-2) Drawing for binding sites of C1027-Chr with DNA heptamer. Side (left) and front (right) views of the binding interfaces. The strand d(C3C4A5T6)/d(A9T10G11G12) is colored in pink/light blue.



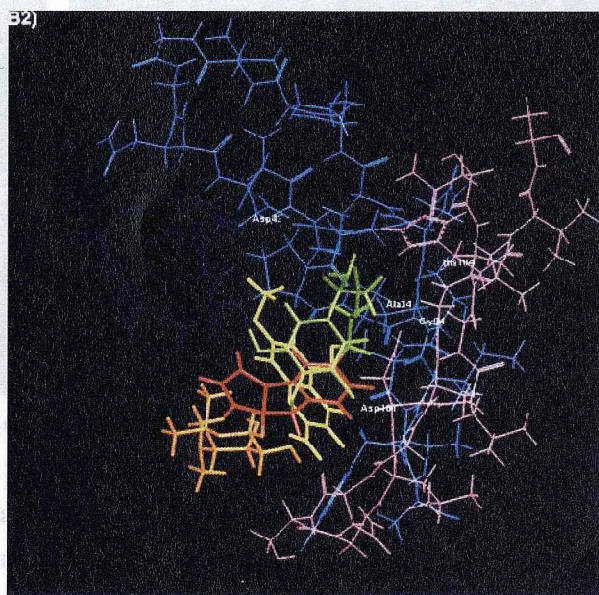
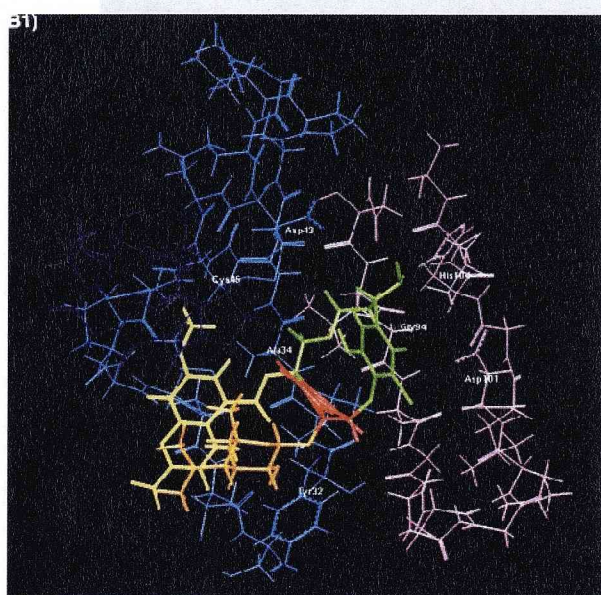
(Figure C-3) NMR model of C1027-Chr - d(GTATAC)2 complex



(Figure C-4) Molecular electrostatic potential of the binding pocket of Apo, enediyne core, and BO of Chr.



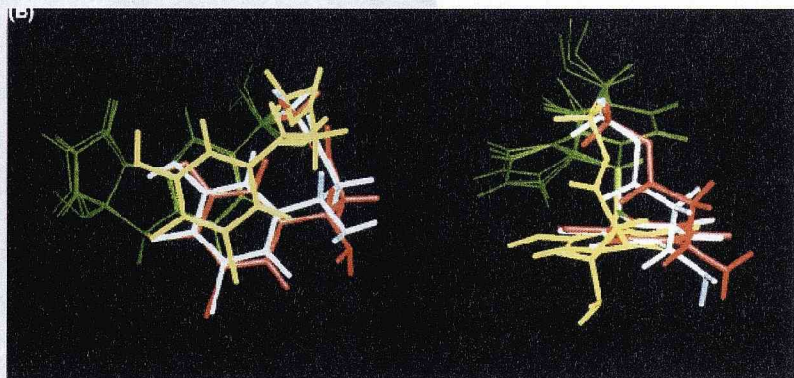
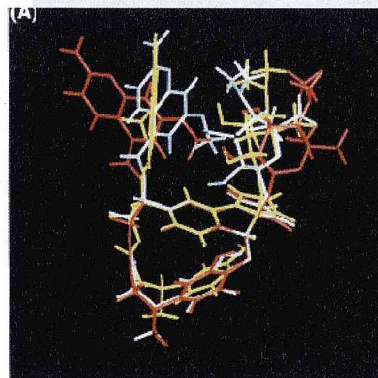
(Figure C-5) Whole structure (left) and binding pocket (right) models of C1027-Apo - Chr complex based on CHARMM calculation.



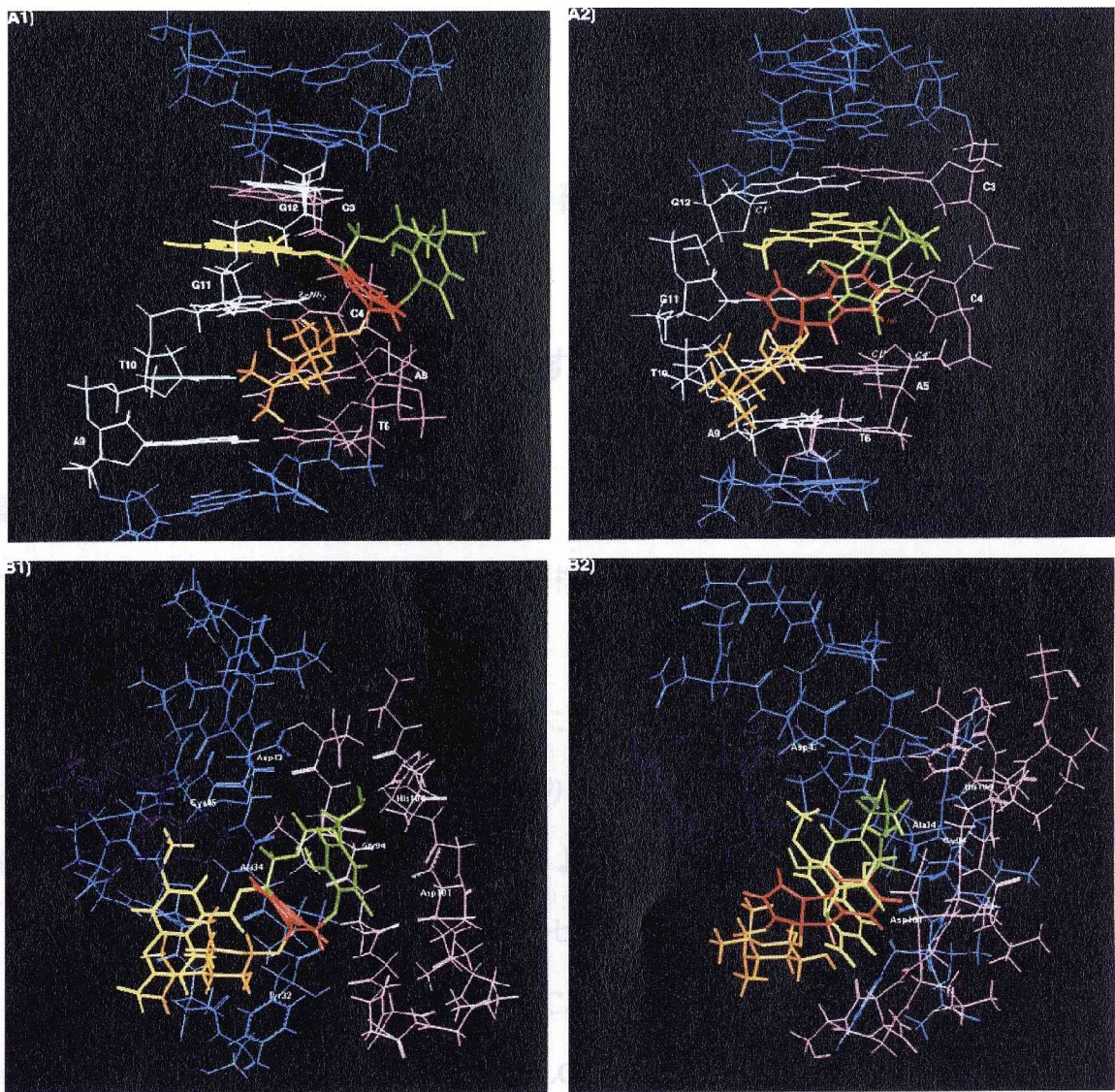
(Figure C-6) Drawing for binding sites of C1027-Chr with C-1027 Apo. Side (left) and front (right) views of the binding interfaces. Tyr32-Ser52, Ser74-Thr79, and Asn92-Ala106 residues composing the pocket of Apo are shown with blue, purple, and pink colors, respectively.



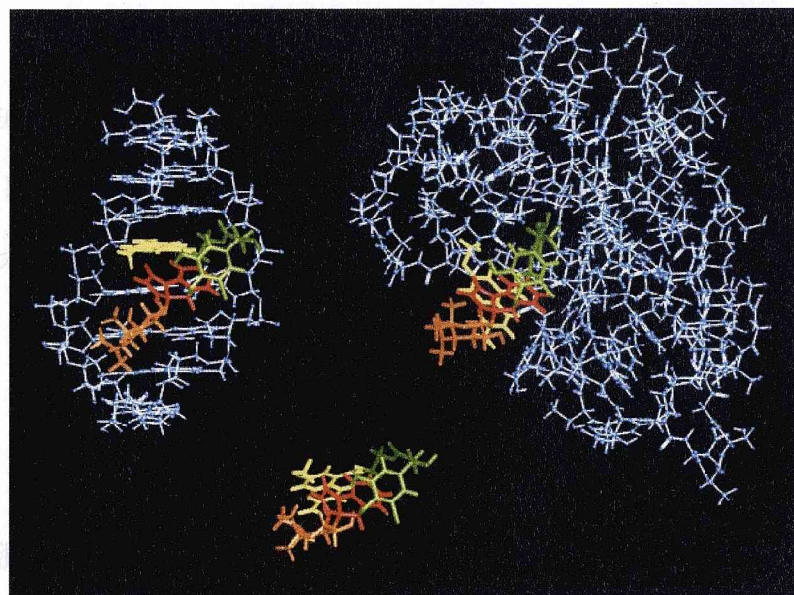
(Figure C-8) Eight superposed distance-refined resolution structures of free Chr



(Figure C-9) Superposition of C-1027 Chr bound to DNA (red) or Apo (yellow), and free Chr (light blue). The AEB moiety of Chr is superposed upon these three forms. A represents stereoview of the whole structures in these three states, and B indicates a conformational comparison of the MC moieties. Superposed AEB moieties are colored green. The viewpoint on the left differs from that on the right in B.



(Figure C-7) Drawing for binding sites of C1027-Chr with DNA heptamer (A) and C-1027 Apo (B). Side (A1 and B2) and front (A2 and B1) views of the binding interfaces. The AEB orientation of C1027-Chr in A1 and A2 is the same as that in B1 and B2, respectively. The strand d(C3C4A5T6)/d(A9T10G11G12) is colored in pink/light blue. Tyr32-Ser52, Ser74-Thr79, and Asn92-Ala106 residues composing the pocket of Apo are shown with blue, purple, and pink colors, respectively.



(Figure C-10) Solution structures of C1027-Chr - DNA heptamer complex (left), free Chr (center), and C1027-Chr - Apo complex (right). DNA and Apo are represented with light blue in ball-and-stick models. C1027-Chr consists of AEB (red), MC (green), BO (yellow), and AS (orange).

実験の部

第1章に関する実験

試料調製

C-1027クロモフォア(Chr)は、大鵬薬品工業(株)の大谷敏夫博士のご厚意により供給されたものを使用した。d(GTATAC)オリゴマーは、Applied Biosystems社の391-DNA合成装置を用いて固相フォスフォアミダイト法により合成した。縮合をおこなった後、20%アンモニア水によってDNAをカラムから切り出し、密栓して55度で8時間放置した。減圧濃縮後、逆相C₁₈カラムを装着したHPLCにより精製、分取した。溶出は0.1Mトリエチルアミン-酢酸緩衝液(pH7.0)中、5~50%アセトニトリルの直線濃度勾配で行った。この際、流速は1mL/minとした。また、d(TGCCATC)/d(GATGGCA)オリゴマーは、合成物をPharmacia社より購入し、上記と同様にHPLCにより精製した。定量は、それぞれのオリゴマーの紫外線吸光度から計算した。アニーリングは、80℃1分間の後に室温まで自然冷却した。d(TGCCATC)/d(GATGGCA)-Chr複合体サンプルは、複合体濃度2mMに30mM NaClを含みpH7.0に調製したものを用いた。

NMR測定

NMR装置は、JEOL製600MHz-NMR装置(Lambda-600)およびBruker製750MHz-NMR装置(DMX-750)を使用した。軽水溶解サンプルは、WATERGATEパルスシーケンス⁷⁸あるいは1,1-echoパルスシーケンスを組み込んだパルスシーケンスを用い、重水溶解サンプルはプレサチュレーション法を用いることにより、水シグナルの消去を行った。

DNAオリゴマーとC1027-Chrとの滴定実験は、軽水サンプルを15℃で1次元¹H-NMR測定を行い、イミノプロトン領域の変化を追跡した。軽水サンプルのNOESY測定は混合時間150ms、200ms、測定温度15℃で測定した。重水サンプルについてはNOESY(混合時間:

100, 150, 200ms)、TOCSY (混合時間: 80ms)、DQF-COSY測定を行った。ピークの帰属については本文中に記した。

NOE距離拘束分子動力学計算

観測されたすべてのNOE ピークについてソフトウェアFelixを用いてピーク体積を求め、さらに2スピン近似によりそれぞれの相関ピーク間の距離を算出した。距離拘束の範囲として、算出距離+0.5 Åを上限值とし、1.8 Åを下限值として設定した。メチル基のプロトンに対しては3つのプロトンの中心位置に疑似原子を置いて、上限値に0.5 Åを加えることにより補正した。また、塩基対を保持するために、塩基対間の18個の水素結合に対して拘束条件 60 kcal/molÅ²を加えた。

すべての分子動力学計算はXPLORを用いて行った。Chr およびDNA-Chrドッキングモデルの初期構造はQuantaグラフィックソフトウェアを用いて作成した。またChrの電荷はMOPACで計算することにより決定した。このように発生させた初期構造について、まず第一に500ステップのコンジュゲートグラジエントエネルギー最小化を実行した。つづいて、5ps間にわたって10Kから1000Kまで加熱していき、次の6ps間には1000Kの状態で、2kcal/molÅ²から30kcal/molÅ²に至るまで徐々にNOEの拘束力を強めていった。(これ以降、系の拘束力は30kcal/molÅ²を維持してシミュレーションを続けた。)そして、10psの間1000Kに維持され、次の7ps間に300Kまで徐々に冷やされ、最後に300Kのまま20ps間シミュレーションを行った。座標データは最終の4ps間において0.5psごと合計8個の構造を保存した。これら8個の構造モデルを平均化し、さらに2000stepのPowell最小化計算をおこなって最終の最適化構造とした。

第2章に関する実験

試薬

精製されたC-1027およびC-1027アポタンパク質(Apo)は大鵬薬品工業(株)の大谷敏夫博士のご厚意により供給されたものを使用した。活性型のC-1027クロモフォア(Chr)は、0℃の蒸留メタノールでC-1027から抽出したものをを用いた。プラスミドpBR322は大腸菌DH5aFから単離され、制限酵素BamHIとSphIは宝酒造(株)から購入した。

DNAフラグメントの調製と末端標識

pBR322 DNA を制限酵素SphIで切断した。その5'末端はバクテリアアルカリ性フォスファターゼで脱リン酸化し、T4ポリヌクレオチドキナーゼと $[\gamma^{32}\text{-P}]$ ATPを用いて標識した。ついでBamHI で切断した後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製し、目的とする5'末端標識BamHI-SphI断片を得た。

DNA切断活性の測定

反応溶液は、C-1027 (0.1 μM) あるいはC1027-Chr (1 μM) を含む20mMトリス-塩酸緩衝溶液(20 μL)とし、それぞれのサンプルを37度で0分～180分のさまざまな時間でプレインキュベートした。その後、0.4 μg のスーパーコイルpBR322DNAをサンプルに加え10分間反応させた。反応の停止は氷冷エタノール(80 μL)と0.3M酢酸ナトリウム溶液(pH7.5)をサンプルに一気に加えることにより行った。さらに即座にエタノール沈殿を行い、DNAを回収した。それぞれのDNAサンプルに20 μL の泳動用緩衝液(10%グリセロール、0.05%プロモフェノールブルー)を加えてよく攪拌し、電気泳動用サンプルとした。電気泳動は0.5 $\mu\text{g/mL}$ のエチジウムブロミドを含んだ1%アガロースゲルで行い、TBE緩衝液中(89mMトリス-ホウ酸(pH8)、2mM EDTA)100Vで電気泳動した。つづいてトランスイルミネーター上のゲルをポラロイド665フィルムで撮影し、そのネガをレーザーデンシ

トメーター(LKB Model 2222 Ultro-Scan XL)を用いて解析することでプラスミドのそれぞれのフォームの定量を行った。

切断配列特異性

反応溶液(全量20 μ l)は、C-1027 (1 μ M)あるいはC1027-Chr (10 μ M)と末端標識SalI-BamHI DNAフラグメント、子牛胸腺DNA (5 μ g/mL)を含み、20mMトリス-塩酸緩衝液でpH7.5とした。切断反応は37度で10分間とし、氷冷エタノール(80 μ L)と0.3M酢酸ナトリウム溶液(pH7.5)をサンプルに一気に加えることによって反応を停止させた。そして即座にエタノール沈殿を行い、DNAを回収した。それぞれのDNAサンプルに5 μ Lの泳動用緩衝液(5M 尿素、0.1%キシレンシアノールFF、0.05N 水酸化ナトリウム)を加え、一旦90℃で処理した後、7M尿素を含んだ10%ポリアクリルアミドゲルを用い、TBE緩衝液中(89mMトリス-ホウ酸(pH8)、2mM EDTA)で電気泳動した。塩基配列の同定は、マキシム-ギルバート法⁷⁹により行った。

蛍光スペクトル

測定装置は日立製蛍光スペクトロメーターF-3010を用いた。C1027-Chrは320nmで励起した。Apoのジスルフィド結合の還元は次のように行った。1mMアポタンパク質を100mMリン酸緩衝液中で、2-メルカプトエタノール(150mM)と尿素(5M)とともに45℃、18時間インキュベートした。さらに、モノヨード酢酸を加え、25℃で1時間インキュベートした。サンプルは透析により精製した。ジスルフィド結合の還元はCDスペクトルによって確認した。

円二色性(CD)スペクトル測定

測定装置はJasco J-720スペクトロメーターを用いた。C-1027、Apo、およびChrそれぞれを100mMリン酸緩衝液(pH8.2)に溶解し、200 μ Mに調製した。波長増加率は2.0nmに設定され、シグナル平均化は1.0秒で行われた。測定温度は15℃で、おのこのスペクト

ルは5回積算で平均化し、バックグラウンド補正を行った。C-1027のApoとChrのスペクトルは足し合わされ、カーブスムジングを行った。

C-1027アポタンパク質、C-1027 (Apo-Chr複合体) のモデリング

モデリングにはQuantaソフトウェアを用い、計算はCHARMM力場を使用した。方法の詳細は本文中に記載している。

C-1027 (Apo-Chr複合体) のNMR立体構造

C-1027 (Apo-Chr複合体) のNMR法を用いて決定された構造の座標データは、サントリー生有研の石黒博士より供与していただいた。

第3章に関する実験

Chrの¹H-NMR測定、および構造化計算

サンプルは、芳香環化Chrのみを含む1mM, pD6.8の重水溶液とした。ROESY測定 (80, 100, 150ms) 22℃で行われた。観測されたすべてのROE ピークのピーク体積から、2 スピン近似によりそれぞれの相関ピーク間の距離を算出した。ただし、オフセット依存性を考慮にいれた⁸⁰。距離拘束の範囲として、算出距離+0.1 Åを上限值とし、1.8 Åを下限值として設定した。ROE距離拘束分子動力学計算は1章のDNA-Chr複合体の時と同じ条件で行った。温度可変1次元¹H-NMR測定は22℃から42℃にわたって測定をした。

Ab initio 計算

すべての計算はGAUSSIAN94を用いた。C1027-Chrのビラジカル部分とクロロフェノール部分そのものを使用する代わりに、それぞれパラ - ベンジン型 - ビラジカル環とベンゼン環を用いた系で計算をおこなった。パラ - ベンジン型 - ビラジカル環とベンゼン環をBPW91を用いたdensity functional theory (DFT)により最適化し、2つの状態 (DNA結合状態、Apo結合状態) におけるC1027-Chrのビラジカル部分とクロロフェノール部分の座標に、パラ - ベンジン型 - ビラジカル環とベンゼン環とをそれぞれ重ね合せた。各々の状態における系の零点振動エネルギー(ZPE)がスケール因子(0.993)から計算された。さらに、BPW91/cc-pVTZ およびCCSD(T)/cc-pVTZを用いて1点エネルギー計算をし総エネルギー (E_{tot})を算出した。一重項 - 三重項エネルギー差はEq.1に従って求めた。

$$\Delta E_{ST} = (E_{tot} + ZPE)_{\text{triplet}} - (E_{tot} + ZPE)_{\text{singlet}} \text{ ----- (Eq.1)}$$

結語および要約

抗腫瘍抗生物質C-1027はエンジインクロモフォア (Chr) が、アポタンパク質 (Apo)に非共有結合的に会合したクロモプロテイン複合体として存在しており、その薬理活性は活性本体であるChrがApoにより核内に輸送された後に放出され、DNAの特定配列を認識、切断するものと考えられている。他のエンジイン化合物とは異なり、C1027-Chrは極めて不安定であり、自発的にその反応が進行するという特異性を有する。著者は、NMR法を中心とした構造解析法を用いて、(1) C1027-Chr - DNA相互作用解析、(2) C1027-Chr - Apo相互作用解析、そして(3) DNA, 溶液中, Apo間におけるChrの動的構造変化と反応性相関などについて研究し、C-1027のDNAおよびApo分子認識機構および反応メカニズムの本質を以下のように明らかにした。

第一章

C-1027クロモフォア - DNA複合体の構造解析と精密分子認識機構

d(T1G2C3C4A5T6C7)/d(G8A9T10G11G12C13A14)オリゴマーと芳香環化したC1027-Chrとの1 : 1複合体についてNMR測定を行った。NOESY測定からDNAの分子内NOE 144個、Chrの分子内NOE33個、DNAとChrとの分子間NOE36個の合計213個のNOEピークが決定された。これらのNOE距離情報に基づく分子動力学計算の結果、RMSD値 0.72 ± 7 複合体最適化構造モデルの構築に成功した。本モデルから、C1027-Chrはベンゾオキサゾリン環(BO)部分のC3G12-C4G11塩基対間へのインターカレーションおよびアミノ糖(AS)部分のA5T6/A9T10G11配列のマイナーグループへの結合を通して、DNAのC3C4A5T6/A9T10G11G12を認識していることが示された。ここで、芳香環化エンジイン部分の3位と6位のプロトンは、G12のH1'(距離 4.72 \AA)とA5のH1'(3.26 \AA)またはH4'(2.18 \AA)と接近

しており、これらの水素を引き抜いてDNA切断を誘起しているものと予想される。一方、他のオリゴマーであるd(GTATAC)₂とChrとの複合体のNMR構造モデルの構築も同様に行ったところ、d(TGCCATC)/d(GATGGCA)の場合と類似した結合様式を示しており、本研究で明らかにしたC1027-ChrのDNA結合様式が他の認識配列にも通用する普遍性を有していることが示唆された。

第二章

C-1027クロモフォア - アポタンパク質複合体の

構造解析と精密分子認識機構

C1027-Apo-Chr複合体および単独のChrを用いたDNA切断実験を比較することにより、C1027-ApoはDNAとの反応には無関係であるがChrの活性保護と運搬の役割を担っていることが示された。蛍光分光法、CDスペクトル法を用いて、Apo-Chr相互作用について検討したところ、ChrはApoと1 : 1で結合しており、ChrのBO環がApoとの相互作用に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、経験的分子力場計算 (CHARMM力場) に基づいて、C1027-Apo-Chr複合体の立体構造モデルの構築を試みた。CHARMM力場を用いてApoとChrそれぞれのファンデルワールスポテンシャル、静電ポテンシャルを算出し、ApoとChr互いのポテンシャル値が相殺して出来るだけ低くなるように複合体モデルを構築した。しかしながら、NMR構造モデルと比較したところ、BO環の配置が異なっていることがわかった。これはファンデルワールス相互作用の算出におけるCHARMM力場計算の限界を示唆している。これらのApo-Chr複合体モデルに基づいて、Apoはそのポケットの疎水性環境内にChrを包含するばかりでなく、エンジン環をBO部分、AS部分、クロロフェノール部分、さらにはTyr32残基によって取り囲むことにより、Chrを安定化させていることが推定された。

第三章

アポタンパク質結合状態およびDNA結合状態における

抗腫瘍活性種C-1027クロモフォアの動的構造変化と反応メカニズム

C1027-Chr-DNA複合体およびChr-Apo複合体のNMR構造モデルを詳細に比較することにより、C1027-ChrによるDNAとApoの認識様式の相違を検討した。ChrのDNA認識には、主にBOとAS部分が重要な役割を果たしているのに対し、MC部分はDNAとの顕著な相互作用が認められなかった。一方、ChrのApo認識には、主にBOとMC部分が重要な役割を果たしているのに対し、AS部分はApoとほとんど相互作用していない。さらに、この相違は水素引き抜き反応を演じるエンジンの活性（安定性）にも大きく反映しているものと考えられる。また、DNA結合状態>溶液状態>>Apo結合状態の順にあるC1027-Chrの反応性がChrのコンフォメーション変化に起因している可能性を検討するために、これら3状態におけるChrの平均最適化構造を、エンジン環を基準に重ね合わせた。その結果、C1027-Chrはクロロフェノールを含むMC部分のコンフォメーションを変化させることにより、Apo内よりもDNA内の方において反応性を上昇させていることが示唆され、この反応性の相違はab initio計算からも立証された。

以上、本研究において、NMR立体構造解析に基づいて、C-1027クロモフォアという1つの分子がDNAとタンパク質という異なる2種類の生体高分子を認識する多分子認識の解明、さらにはそれぞれの分子認識の相違がそのままクロモフォアの活性発現の相違へとつながる構造活性相関の解明に成功し、抗腫瘍抗生物質C-1027のDNAおよびApo分子認識機構および反応メカニズムを明らかにした。

これらの結果は、エンジン抗腫瘍抗生物質の作用メカニズムの分子レベルでの理解に役立つばかりでなく、新しい核酸標的分子や蛋白質標的分子の合理的設計にも有用な知見を提供するものと思われる。

引用文献

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* 1953, 171, 737.
- (2) McHugh, M. M.; Beerman, T. A.; Burhans, W. C. *Biochemistry* 1997, 36, 1003.
- (3) Hu, J.; Xue, Y. -C.; Xie, M. -Y.; Zhang, R.; Otani, T.; Yamada, Y.; Marunaka, T. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1988, 41, 1575.
- (4) Zhen, Y. -S.; Ming, X. -Y.; Yu, B.; Otani, T.; Saito, H.; Yamada, Y. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1989, 42, 1294.
- (5) Otani, T.; Minami, Y.; Marunaka, T.; Zhang, R.; Xie, M. -Y. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1988, 41, 1580.
- (6) Otani, T. *J. Antibiot.* 1993, 46, 791.
- (7) Otani, T.; Yasuhara, T.; Minami, Y.; Shimazu, T.; Zhang, R.; Xie, M.-Y. *Agric. Biol. Chem.* 1991, 55, 407.
- (8) Otani, T.; Minami, Y.; Sakawa, K.; Yoshida, K. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1991, 44, 564.
- (9) Sugiura, Y.; Matsumoto, T. *Biochemistry* 1993, 32, 5548.
- (10) Otani, T.; Minami, Y.; Yoshida, K.; Azuma, R.; Saeki, M. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 2633.
- (11) Otani, T.; Yoshida, K.; Minami, Y.; Azuma, R.; Saeki, M. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 2637.
- (12) Hirama, M.; Iida, K.; Ishii, T. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 4079.
- (13) Jones, R. R.; Bergman, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 94, 660.
- (14) Xu, J.; Wu, J.; Dedon P. C. *Biochemistry* 1998, 37, 1890.
- (15) Kumar, R. A.; Ikemoto, N.; Patel, D. J. *J. Mol. Biol.* 1997, 265, 173.
- (16) Long, B. H.; Olik, J.; Forenza, S.; Ward, B.; Reh fuss, R.; Dabrowiak, J. C.; Catino, J. J.; Musial, S. T.; Brookshire, K. W.; Doyle, T. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 86, 2.
- (17) Uesugi, M.; Sugiura, Y. *Biochemistry* 1993, 32, 4622.
- (18) Golik, J.; Clardy, J.; Dubay, G.; Groenewold, G.; Kawaguchi, H.; Konishi, M.; Krishnan, B.;

- Ohkuma, H.; Saitoh, K.; Doyle, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, *109*, 3461.
- (19) Golik, J.; Dubay, G.; Groenewold, G.; Kawaguchi, H.; Konishi, M.; Krishnan, B.; Ohkuma, H.; Saitoh, K.; Doyle, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, *109*, 3462.
- (20) Kumar, R. A.; Ikemoto, N.; Patel, D. J. *J. Mol. Biol.* 1997, *265*, 187.
- (21) Lee, M. D.; Ellestad, G. A.; Borders, D. B. *Acc. Chem. Res.* 1991, *24*, 235.
- (22) Ikemoto, N.; Kumar, R. A.; Ling, T.-t.; Ellestad, G. A.; Danishefsky, S. J.; Patel, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, *92*, 10506.
- (23) Lee, M. D.; Dunne, T. S.; Siegel, M. M.; Chang, C. C.; Morton, G. O.; Borders, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, *109*, 3464.
- (24) Lee, M. D.; Dunne, T. S.; Chang, C. C.; Ellestad, G. A.; Siegel, M. M.; Morton, G. O.; McGahren, W. J.; Borders, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, *109*, 3466.
- (25) Sugiura, Y.; Shiraki, T.; Konishi, M.; Oki, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990, *87*, 3831.
- (26) Kusakabe, T.; Uesugi, M.; Sugiura, Y. *Biochemistry* 1995, *34*, 9944.
- (27) Konishi, M.; Ohkuma, H.; Matsumoto, K.; Tsuno, T.; Kamei, H.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1989, *42*, 1449.
- (28) Kappen, L. S.; Goldberg, I. H. *Science* 1993, *261*, 1319.
- (29) Dedon, P. C.; Goldberg, I. H. *Chem. Res. Toxicol.* 1992, *5*, 311.
- (30) Gao, X.; Stassinopoulis, A.; Rice, J. S.; Goldberg, I. H. *Biochemistry* 1995, *34*, 40.
- (31) Ishida, N.; Miyazaki, K.; Kumagai, K.; Rikimaru, M. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1965, *Ser.A18*, 68.
- (32) Kim, K.-H.; Kwon, B.-M.; Myers, A. G.; Rees, D. C. *Science* 1993, *262*, 1042.
- (33) Zein, N.; Colson, K. L.; Leet, J. E.; Schroeder, D. R.; Solomon, W.; Doyle, T. W.; Casazza, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, *90*, 2822.
- (34) Leet, J. E.; Schroeder, D. R.; Hofstead, S. J.; Golik, J.; Colson, K. L.; Huang, S.; Klohr, S. E.; Doyle, T. W.; Matson, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, *114*, 7946.
- (35) Leet, J. E.; Schroeder, D. R.; Langley, D. R.; Colson, K. L.; Klohr, S. E.; Lee, M. S.; Golik, J.; Hofstead, S. J.; Doyle, T. W.; Matson, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, *115*, 8432.

- (36) Zein, N.; Casazza, A. M.; Doyle, T. W.; Leet, J. E.; Schroeder, D. R.; Solomon, W.; Nadler, S. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993, 90, 8009.
- (37) McHugh, M. M.; Woynarowski, J. M.; Gawron, L. S.; Otani, T.; Beerman, T. A. *Biochemistry* 1995, 34, 1805.
- (38) Cobuzzi, R. J.; Kotsopoulos, S. K.; Otani, T.; Beerman, T. A. *Biochemistry* 1995, 34, 583.
- (39) Yoshida, K.; Minami, Y.; Otani, T.; Tada, Y.; Hiram, M. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 5253.
- (40) Iida, K.; Hiram, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 8875.
- (41) Xu, Y. J.; Zhen, Y. S.; Goldberg, I. H. *Biochemistry* 1994, 33, 5947.
- (42) Xu, Y.-j.; Xi, Z.; Zhen, Y.-s.; Goldberg, I. H. *Biochemistry* 1995, 34, 12451.
- (43) Piantini, U.; Sorenson, O. W.; Ernst, R. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 6800.
- (44) Bax, A.; Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* 1985, 65, 355.
- (45) Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* 1979, 71, 4546.
- (46) Wuthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*; Wiley: New York, 1986.
- (47) Yu, L.; Mah, S.; Otani, T.; Dedon, P. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 8877.
- (48) Lin, X. L.; Chen, H.; Patel, D. J. *J. Biomol. NMR* 1991, 1, 323.
- (49) Patel, D. J.; Shapiro, L. *Biopolymers* 1986, 25, 707.
- (50) Feigon, J.; Denny, W. A.; Leupin, W.; Kearns, D. R. *J. Med. Chem.* 1984, 27, 450.
- (51) Manderville, R. A.; Ellena, J. F.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 7891.
- (52) Matsumoto, T.; Sugiura, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994, 205, 1533.
- (53) Conner, B. N.; Takano, T.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E. *Nature* 1982, 295, 294.
- (54) Khokhlov, A. S.; Cherches, B. Z.; Reshetov, P. D.; Smirnov, V. V.; Navashin, S. M.; Fomina, I. P. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1969, 22, 541.
- (55) Roey, P. V.; Beerman, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 86, 6587.
- (56) Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M. *J. Comp. Chem.* 1983, 4, 187.
- (57) Levitt, M.; Lifson, S. *J. Mol. Biol.* 1969, 46, 269.

- (58) Edo, K.; Saito, K.; Akiyama-Murai, Y.; Mizugaki, M. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1988, 41, 554.
- (59) Kondo, H.; Nakatani, H.; Hiromi, K. *J. Biochem.* 1976, 79, 393.
- (60) Dean, P. M.; Wakelin, L. P. G. *Proceedings of the Royal Society, London B* 1980, 209, 453.
- (61) Dean, P. M.; Wakelin, L. P. G. *Proceedings of the Royal Society, London B* 1980, 209, 473.
- (62) Dean, P. M. *Perspectives in Computing* 1983, 3, 14.
- (63) Komatsu, K.; Nakamura, H.; Nakagawa, S.; Umeyama, H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1984, 32, 3313.
- (64) Snyder, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 7630.
- (65) Magnus, P.; Fortt, S.; Pitterna, T.; Snyder, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 486.
- (66) Langley, D. R.; Doyle, T. W.; Beveridge, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 486.
- (67) Langrey, D. R.; Golik, J.; Krishnan, B.; Doyle, T. W.; Beveridge, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 15.
- (68) Ueno, M.; Tanaka, T.; Hiram, M.; Imajo, S.; Ishiguro, M.; Mizugaki, M.; Edo, K.; Komatsu, H. *Tetrahedron Lett.* 1991, 32, 3175.
- (69) Ishiguro, M.; Imajo, S.; Hiram, M. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 2366.
- (70) Hiram, M.; Tanaka, T.; Fujita, K.; Imajo, S.; Ishiguro, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1993, 1205.
- (71) Iida, K.; Fukuda, S.; Tanaka, T.; Hiram, M.; Imajo, S.; Ishiguro, M.; Yoshida, K.; Otani, T. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 4997.
- (72) Nicolaou, K. C.; Zuccarello, G.; Ogawa, Y.; Schweiger, E. J.; Kumazawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 4866.
- (73) Nicolaou, K. C.; Zuccarello, G.; Riemer, C.; Estevez, V. A.; Dai, W.-M. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 7360.

- (74) Stassinopoulos, A.; Ji, J.; Gao, X.; Goldberg, I. H. *Science* 1996, 272, 1943.
- (75) Logan, C. F.; Chen, P. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 2113.
- (76) Cramer, C. J.; Squires, R. R. *J. Phys. Chem.* 1997, A101, 9191.
- (77) Cramer, C. J.; Nash, J. J.; Squires, R. R. *Chem. Phys. Lett.* 1997, 277, 311.
- (78) Piotto, M.; Sandek, V.; Sklenar, V. *J. Biomol. NMR* 1992, 2, 661.
- (79) Maxam, A. M.; Gilbert, W. *Methods Enzymol.* 1980, 65, 499.
- (80) Kessler, H.; Bats, J. W.; Griesinger, C.; Koll, S.; Will, M.; Wagner, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 1033.

謝 辞

終わりに臨み、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都大学化学研究所 杉浦 幸雄 教授に謹んで感謝の意を表します。

ご懇切なご指導ならびにご激励を戴きました 大塚 雅巳 先生（現 熊本大学助教授）、岩下 孝 博士（サントリー生物有機科学研究所）に心より感謝の意を表します。また、折にふれご討議やご激励を頂きました 桑原 淳 博士（現 徳島大学助教授）、森井 孝 博士（現 京都大学エネルギー理工学研究所助手）、上杉 志成 博士（現 Baylor大学準教授）、二木 史朗 博士（京都大学化学研究所助教授）に深く感謝致します。

貴重な抗生物質C-1027を寛大にご提供下さいました大鵬薬品工業 大谷 敏夫 博士、C-1027のNMR構造の座標データを親切にもご提供下さいましたサントリー生物有機科学研究所 石黒 正路 博士に心より感謝致します。

実験の一部にご協力下さった 松本 卓之 博士（第一製薬）、荒木 通啓 修士、そしてご指導、ご討議いただいた京都大学化学研究所 生体反応設計研究部門Ⅱの皆様に深謝いたします。

最後に、私をこれまであたたかく育てていただいた父母、祖父母、姉兄、妻にあらためて感謝するとともに、時として、主となり、師となり、親となって、私の人生を支え続けていただいた恩師 竹内 日遼 上人に衷心より感謝申し上げます。